ISOLIERUNG UND REINIGUNG DER POLY- UND METAPHOSPHATE AUS DER BLAUALGE ANACYSTIS NIDULANS

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

RAINER NIEMEYER

aus Genthin

1969

ISOLIERUNG UND REINIGUNG DER POLY- UND METAPHOSPHATE AUS DER BLAUALGE ANACYSTIS NIDULANS

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

R a i n e r N i e m e y e r

aus Genthin

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Dezember 1969
Dekan: Prof. Dr. A.Seilacher
1. Berichterstatter: Prof. Dr. G.Richter
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bünning

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methoden	4
1. Versuchsorganismus und Kultur	4
2. Markierungsexperimente mit ^{32}P-Orthophosphat	4
3. Isolierung kondensierter anorganischer Phosphate	5
4. Säulenchromatographie an methyliertem Serumalbumin (MAK)	6
5. Säulenchromatographie an Cellulose-Ionenaustauschern	7
6. Gelfiltration an Sepharose	7
7. Säulenchromatographie an QAE-Sephadex A 50	8
8. Bestimmung der Basenzusammensetzung von RNS-Komponenten	8
9. Enzymatischer Abbau mit Ribonuklease (RNase)	9
10. Enzymatischer Abbau mit Desoxyribonuklease (DNase)	9
11. Dünnschichtchromatographische Trennung von kondensierten anorganischen Phosphaten	9
PEI-Cellulose	9
Cellulose	10
12. Chemikalien	11
13. Abkürzungen	11
Ergebnisse	13
I. Experimentelle Voraussetzungen für eine gezielte ^{32}P-Markierung kondensierter Phosphate	13
1. Phosphatverarmung	13
2. Zelldichte	13
3. Markierungsdauer	15
4. Konzentration von ^{32}P-Orthophosphat	15
II. Identifizierung der schnellmarkierten Phosphorverbindungen	17
1. Anfärben mit Toluidinblau	17
2. RNase- und DNase-Behandlung	17
3. Saure Hydrolyse	18

Seite

III. Isolierung und Reinigung ^{32}P-markierter kondensierter Phosphate 19
1. Säulenchromatographie an MAK 19
2. Säulenchromatographie an QAE-Sephadex A 50 21
3. Modifizierte Säulenchromatographie an MAK 21

IV. Identifizierung der schnellmarkierten kondensierten Phosphate 25
1. Dünnschichtchromatographie an PEI-Cellulose 25
2. Rechromatographie an QAE-Sephadex A 50 26
3. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie an Cellulose 27
A. Kondensierte ^{32}P-Phosphate von der Eluat-Fraktion nach modifizierter MAK 27
B. Zusammensetzung der kondensierten ^{32}P-Phosphate nach Vorreinigung über QAE-Sephadex A 50 29

V. Vergleich mit konventionellen Extraktionsmethoden 35

VI. Zur Existenz eines RNS-Poly-Phosphat-Komplexes 47

Diskussion
1. Reinigung der kondensierten Phosphate 52
2. Die markierten kondensierten Phosphate aus Anacystis 55
3. RNS-Polyphosphat-Komplex 60

Zusammenfassung 62

Literaturverzeichnis 65

Einleitung

An vielen Stoffwechselprozessen in der Zelle sind phosphathaltige Verbindungen beteiligt. In den letzten Jahren hat sich dementsprechend die biochemische Forschung in zunehmendem Maße mit dem Phosphorstoffwechsel beschäftigt. Allerdings schenkte man dabei den kondensierten anorganischen Phosphaten relativ wenig Beachtung. Vielleicht spielte dabei der Umstand eine Rolle, daß diese Verbindungen bisher vorwiegend bei niederen Organismen wie Bakterien, Pilzen und Algen nachgewiesen wurden. Abgesehen von einem Nachweis in Tomaten(KLEIN 1952), sind erst in jüngster Zeit Plyphosphate auch in höheren Organismen gefunden worden: in Spinatblättern (MIYACHI 1961), in Cuscuta reflexa (TEWARI u. SINGH 1964), in Maiswurzeln (VAGABOV u. KULAEV 1964), in Mitochondrien der Rattenleber (LYNN u. BROWN 1963), in tierischen Zellkernen (GROSSMANN u. LANG 1962; PENNIALL, HALL, GRIFFIN u. IRVIN 1962; PENNIALL u. GRIFFIN 1964; GRIFFIN, DAVIDSON u. PENNIALL 1965 sowie GRIFFIN u. PENNIALL 1966) und in Geweben des Frosches (SHIOKAWA u. YAMANA 1965).

Neue Impulse erhielt die Erforschung zellulärer kondensierter Phosphate durch die Vermutung, die kondensierten anorganischen Phosphate könnten auf Grund ihres chemischen Aufbaues neben dem Adenosintriphosphat eine wichtige Rolle im Energiehaushalt der Zelle spielen (KUHL 1962; HOFFMANN-OSTENHOF 1962; KALTWASSER 1962; MIYACHI, KANAI, MIHARA u. MIYACHI 1964; STEVENINCK 1964; HAROLD 1965; KANAI u. SIMONIS 1968a + b; LYSEK u. SIMONIS 1968a + b sowie ULLRICH u. SIMONIS 1969). Die Untersuchungen dieser Autoren erstreckten sich in erster Linie auf die Bedeutung der kondensierten Phosphate für Photosynthese und Phosphorylierungsprozesse. Die von ihnen verwendeten Extraktionsmethoden, die teilweise in den letzten Jahren erheblich verfeinert wurden (AOKI u. MIYACHI 1964; KANAI, AOKI u. MIYACHI 1965), be-

dienen sich entweder einer Behandlung der Zellen mit Säure (kalte Trichloressigsäure und heiße Salzsäure) oder mit Laugen (KOH, NaOH) bzw. einer Kombination von beiden. Nach den einzelnen Extraktionsschritten werden 4 verschiedene Fraktionen unterschieden (vgl. TAMIYA 1966): Poly-Pi "A" "B" "C" und "D". Poly-Pi "A" ist säurelöslich und soll in den Volutingranula vorliegen und mit RNS assoziiert sein (HASE, MIYACHI u. MIHARA 1963). Für diese Verbindung werden über 20 Phosphorsäurereste angenommen. Poly-Pi "B" ist säureunlöslich aber mit verdünntem Alkali extrahierbar. Als Poly-Pi "C" wird eine Fraktion bezeichnet, die sich mit KOH aus den Zellen lösen läßt und bei Neutralisation des Extraktes mit konzentrierter Perchlorsäure zusammen mit dem entstehenden Kaliumperchlorat ausfällt. Poly-Pi "D" wird zusammen mit Poly-Pi "C" gewonnen (s.o.), fällt aber im Gegensatz zum Letzteren beim Neutralisieren des Extraktes mit Perchlorsäure nicht aus. Physiologisch sollen Poly-Pi "B" und "D" als Phosphatreservoir der Zellen fungieren (MIYACHI, KANAI, MIHARA, MIYACHI u. AOKI 1964; KANAI, AOKI u. MIYACHI 1965).

Bei den vorgenommenen Extraktionen kondensierter Phosphate mittels Säuren und Laugen von teilweise beachtlicher Stärke läßt sich freilich nicht ausschließen, daß einerseits kondensierte anorganische Phosphate infolge hydrolytischer Spaltung dem Nachweis völlig entzogen werden, andererseits solche mit hohem Kondensationsgrad zu niedermolekularen Kunstprodukten umgewandelt werden. Aussagen über physiologische Funktionen und quantitative Verteilung kondensierter Phosphate, welche nach den oben geschilderten Verfahren isoliert wurden, sind daher nur bedingt möglich, wie auch von einigen Autoren angemerkt wird (LANGEN u. LISS 1958, s. auch KUHL 1960).

Hierin ist auch ein wesentlicher Grund zu suchen, warum in der vorliegenden Arbeit andere Wege bei der Extraktion und Reinigung von kondensierten Phosphaten beschritten wurden. Das besondere Interesse an den schnellmarkierten Komponenten dieser Verbindungsklasse beruht auf der Beobachtung, daß bereits früher bei den Grünalgen Acetabularia crenulata und Chlorella pyrenoidosa in Kurzzeit-Markierungsexperimenten mit ^{32}P-Orthophosphat ein beträchtlicher ^{32}P-Einbau in eine Zellfraktion beobachtet worden war, die zwar mit den Nukleinsäuren isolierbar, aber nicht mit diesen identisch war. Erste Untersuchungen hatten gezeigt, daß es sich dabei um schnellmarkierte Polyphosphate[1] handelte (RICHTER 1966; BEIDERBECK u. RICHTER 1969). Besonders ausgeprägt war die Bildung der Letzteren bei der Blaualge Anacystis nidulans, wenn ihren Zellen nach Phosphatverarmung kurzfristig ^{32}P-Orthophosphat im Licht angeboten wurde (SEITZ 1969). Eingehende Untersuchungen über Natur und Funktion dieser offensichtlich schnell synthetisierten kondensierten Phosphate und ihre Bedeutung für den Stoffwechsel der Zellen, insbesondere für die Nukleinsäure-Synthese, schienen bei diesem Organismus angezeigt. Zudem ließ die angewendete Phenolextraktion eine weitaus schonendere Herauslösung kondensierter Phosphate im Vergleich zur konventionellen Säure- oder Laugenbehandlung erwarten. In der vorliegenden Arbeit wird zunächst eine Methode zur Isolierung der markierten anorganischen Phosphate aus Anacystis nidulans beschrieben, sodann die Zusammensetzung dieser Fraktion untersucht.

[1] Die Begriffe Polyphosphat und Metaphosphat werden der Nomenklatur von THILO (1959) entsprechend verwendet, nachdem viele Autoren früher die Bezeichnung Metaphosphat sowohl für lineare als auch für cyclische kondensierte Phosphate gebrauchten.

Material und Methoden

1. Versuchsorganismus und Kultur

Als Versuchsobjekt diente die blaugrüne Alge Anacystis (Lauterbornia) nidulans. Die Anzucht erfolgte in dem von KRATZ u. MYERS (1955) beschriebenen Medium, jedoch mit dem Unterschied, daß Eisen als EDTA-Fe-Komplex zugesetzt wurde (KUHL 1962). Die Algen wuchsen steril bei 34° C, im Dauerlicht (9 000 Lux) in Kulturröhren aus Jenaerglas (Höhe 42 cm, Durchmesser innen 3,6 cm), in die von unten ein Luft-CO_2-Gemisch mit ca 3% CO_2 eingeleitet wurde. Die Anzuchtröhren standen im temperaturkonstanten Wasserbad eines Lichtthermostaten der Firma F. Kniese, Marburg/Lahn.

2. Markierungsexperimente mit ^{32}P-Orthophosphat

Ein ausreichender Einbau von Radiophosphor in kondensierte anorganische Phosphate war nur dann zu erreichen, wenn die Zellen zuvor an Phosphat verarmt wurden. Zu diesen Zwecken wurden sie niedertourig in vorgewärmter Zentrifuge niedergeschlagen und in P-freier Nährlösung für 20 h normal begast und belichtet. Die Kultur wurde dabei auf eine definierte Zelldichte eingestellt. Dies geschah mit Hilfe eines Selen-Photoelements (Firma Falkenthal und Presser KG, Nürtingen), das im Wasserbad des Lichtthermostaten an der Anzuchtröhre so befestigt war, daß nur das durch die letztere transmittierte und reflektierte Licht der gegenüberstehenden Leuchtstoffröhre registriert wurde. Mittels Spiegelgalvanometer konnte so die Zelldichte gemessen und entsprechend eingestellt werden (s. Ergebnisse). 10 μ C ^{32}P-Orthophosphat pro Milliliter Medium wurden der vorbehandelten Algensuspension zugesetzt und diese am Ende der Einbauzeit sofort auf zerstoßenes Eis gegossen. Die weitere Aufarbeitung der Zellen erfolgt dann bei 0 - 4° C.

3. Isolierung kondensierter anorganischer Phosphate

Die Extraktion erfolgte gemeinsam mit den Nukleinsäuren in Anlehnung an das von RICHTER u. SENGER (1964) beschriebene Verfahren. Die gewaschenen Algen wurden in Tris-Puffer[1] (0,05 M Tris, 0,002 M $MgSO_4$; pH 7,5) suspendiert und mit Glasperlen (0,1 mm Durchmesser) in einer Vibrogen-Zellmühle (Firma Bühler, Tübingen) unter Wasserkühlung (2 bis 4° C) geschüttelt. Das Homogenat wurde mit Hilfe einer Glasfritte von den Perlen befreit, mit einem gleichen Volumen Puffer gesättigten Phenols versetzt, für 5 min. geschüttelt und die wässrige Phase durch Zentrifugieren abgetrennt. Die Phenolphase wurde nochmals mit Tris-Puffer (pH 7,5 bzw. 9,0) extrahiert. Die vereinigten wässrigen Überstände wurden mit einem 2 bis 3 fachen Volumen an Äthanol (99%) versetzt. Der in der Kälte bei minus 18° C entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert mit Äthanol gewaschen und in salzhaltigem Phosphatpuffer (0,05 M; pH 6,7; enthaltend 0,1 M NaCL) gelöst. Dieser aufgelöste Niederschlag, der sowohl die kondensierten Phosphate als auch die Gesamtnukleinsäuren enthält, diente als Ausgangsmaterial (Gesamtextrakt) für die nachfolgenden chromatographischen Trennungen.

Als eine der konventionellen Methoden zur Extraktion von kondensierten anorganischen Phosphaten kam das von KANAI, AOKI u. MIYACHI (1965) beschriebene Verfahren zur Anwendung. Die gewaschenen Zellen wurden ohne Aufschluß sofort mit 8%iger Trichloressigsäure bei 0° C behandelt. Der anfallende Extrakt entspricht der "säurelöslichen Fraktion". Der Rückstand ("säureunlösliche Fraktion") der zwecks Entfernung der Lipide mehrmals mit Alkohol bzw. mit einem Alkohol-Äther-Gemisch (3 : 1) gewaschen worden war, wurde anschließend zweimal mit verdünnter Kalilauge (pH 9) extrahiert. Der Überstand enthielt gelöst die "pH 9-

[1] = Tris (hydroxymethyl) aminomethan

Fraktion" (auch als Poly-Pi "B" bezeichnet). Der Rückstand wurde einer alkalischen Hydrolyse mit 2 N KOH für 16 bis 20 h bei 37° C unterzogen. Nach Neutralisation mit konzentrierter Perchlorsäure fiel ein Niederschlag (Poly-Pi "C") an, während im Überstand die Fraktion Poly-Pi "D" zurückbleibt. Bei Neutralisation mit Trichloressigsäure liegen hingegen beide Komponenten in Lösung vor. Neben Nukleinsäuren enthält diese auch noch Proteine.

Eine weitere Methode, um einen RNS-Polyphosphat-Komplex zu isolieren, benutzt Alkohol zur Extraktion. Hierzu wurde nach einer veränderten Methode von WANG u. MANCINI (1966) verfahren. Die gewaschenen Algen wurden in heißem 80%igem Alkohol suspendiert und nach 15 min. abzentrifugiert (5 min. bei 12 000 g). Es folgten zwei weitere Extraktionen mit kaltem 80%igem bzw. 50%igem Alkohol für je eine Stunde ("Fraktion 1"). Es schloß sich eine weitere Behandlung der Algenzellen mit 50%igem Alkohol für 3 h und für 15 h an. Nach Zentrifugation wurden beide Überstandsfraktionen zur "Fraktion 2" vereinigt und im Rotationsverdampfer auf wenige Milliliter eingeengt. Dieses alkoholfreie Konzentrat wurde nach Verdünnung mit 0,05 M Phosphatpuffer (0,1 M NaCL bei pH 6,7) an einer MAK-Säule adsorbiert. Mit einem logarithmischen Konzentrationsgradienten (0,1 gegen 1,5 M NaCL konnten die kondensierten anorganischen Phosphate isoliert werden; sie wurden anschließend einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie unterworfen (s.u.).

4. Säulenchromatographie an methyliertem Serumalbumin (MAK)

Der oben erwähnte Gesamtextrakt (nach Phenolbehandlung), welcher neben den kondensierten Phosphaten auch die Nukleinsäuren enthält, wurde an einer Säule (1,8 x 10,5 cm) aus methyliertem Serumalbumin mit Kieselgur als Trägersubstanz adsorbiert (MANDELL u. HERSHEY 1960; RICHTER u. SENGER 1964). Zur Erzielung guter Trennungen darf die Säule maximal mit 2,5 bis 3,0 mg Nukleinsäuren (berechnet nach der

optischen Dichte der Lösung bei 260nm) beladen werden. Mit einem logarithmischen Gradienten von 0,1 M gegen 1,5 M NaCL werden die kondensierten Phosphate und die einzelnen Nukleinsäuren nacheinander von der Säule eluiert. Die Absorption der Letzteren wird bei 254 nm im Säuleneluat automatisch gemessen und kontinuierlich registriert. Das Eluat wurde dann mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Proben zu je 5 ml aufgefangen. Die Aktivität der ^{32}P-markierten Phosphate, sowie der ^{32}P-Nukleinsäuren wurde im Eluat ebenfalls fortlaufend und automatisch mit einem Fensterzählrohr in Verbindung mit dem Ratemeter FH 49a (Frieseke und Hoepfner, Erlangen) registriert.

5. Säulenchromatographie an Cellulose-Ionenaustauschern

Die Ionenaustauscher-Cellulose (GE-Cellulose) wurde in einem Puffergemisch (0,1 M Tris, 0,001 M $MgSO_4$; pH 7,6) suspendiert; nach 2 min. wurde vom gebildeten Sediment dekantiert und die restliche Suspension in einem hohen Meßzylinder 90 bis 100 min. stehengelassen. Nach Entfernen des trüben Überstandes wurde 1/10 des Sediments sofort, der Rest nach Zugabe der zu trennenden Probe in das Chromatographie-Rohr eingefüllt und unter leichtem Druck zu einer Säule von 1,8 x 10,0 cm gepackt. Ein logarhitmischer Konzentrationsgradient von 0,1 M KCL in Tris-Puffer (0,1 M; pH 7,6) gegen 1,0 M KCL in gleichem Puffer wurde zur Elution verwendet. Proben von 5 ml wurden gesammelt, die Absorption des Eluats bei 254 nm sowie dessen Radioaktivität fortlaufend registriert.

6. Gelfiltration an Sepharose

Etwa 400 ml Sepharose-Suspension wurden mit Phosphatpuffer (0,05 M Phosphat; 0,001 M $MgSO_4$; pH 6,7) 3 bis 4 mal auf einer Fritte gewaschen, in Phosphatpuffer resuspendiert und in ein Chromatographierohr (2,5 x 70,0 cm) eingefüllt. Nach Waschen mit 200 ml des gleichen Puffer-

gemisches war die Säule gebrauchsfertig. Eine gegossene Säule konnte nach vorangegangenem Waschen für mehrere Trennungen verwendet werden. Die aufzutrennende Probe (maximal 4 ml) wurde mit einer Injektionsspritze vorsichtig auf das Gelbett geschichtet. Die Eluierung erfolgte mit dem oben genannten Puffergemisch (Durchflußgeschwindigkeit 15 bis 25 ml/h). Die UV-Absorption wurde bei 254 nm fortlaufend registriert. Proben von 5 ml wurden gesammelt.

7. Säulenchromatographie an QAE-Sephadex A 50

Proben dieses voll quarternären Ionenaustauschers wurden zunächst ca. 24 h in dest. H_2O gequollen. Durch wiederholtes Umrühren und Dekantieren des Überstandes konnten feinere Partikel entfernt werden. Nach Waschen des gequollenen Gels auf einer Fritte mit salzhaltigem Puffer (0,05 M Phosphat; pH 6,7; 0,1 M NaCL) wurde es vorsichtig in ein Chromatographierohr (1,8 x 10,0 cm) eingefüllt, wobei die Bildung von Blasen vermieden wurde. Nach Adsorption der gelösten Probe wurde die Säule mit einem logarithmischen Gradienten von 0,1 gegen 1,0 M NaCL in Phosphat-Puffer (0,05 M; pH 6,7) entwickelt. Wie bereits oben beschrieben, so wurde auch hier das Eluat vermessen und gesammelt.

8. Bestimmung der Basenzusammensetzung von RNS-Komponenten

Die in den gesammelten Fraktionen angereicherten RNS-Komponenten wurden durch Zugabe von Trägerprotein und $HClO_4$ (Endkonzentration von 5%) ausgefällt und anschließend mit 0,5 N KOH bei 37° C für 18 bis 20 h hydrolysiert. Danach erfolgte die Entfernung von säureunlöslichem Material einschließlich des Trägerproteins durch erneute Zugabe von $HClO_4$; im Überstand verblieben die säurelöslichen Mononukleotide. Er wurde nach Neutralisation vorsichtig in die oberste Schicht einer Dowex-Säule (1,8 x 15,0 cm; Dowex 1 x 2, 200 bis 400 mesh, Cl^- Form) eingeführt. Die Elution

der Nukleotide erfolgte durch einen geteilten Konzentrationsgradienten von H_2O gegen 0,05 M HCl; nach 18 Fraktionen (je 5 ml) wurde letztere durch 0,1 M HCl im Vorratsgefäß versetzt. Die Registrierung von UV-Absorption bzw. ^{32}P-Radioaktivität und die Fraktionierung erfolgten in gleicher Weise wie bei der MAK-Säulenchromatographie (s.o.)

9. Enzymatischer Abbau mit Ribonuklease (RNase)

Gelöste Nukleinsäuren wurden mit 5 g RNase (aus Pankreas) pro ml versetzt und 30 min. bei 30° C und der überoptimalen Ionenstärke von 0,45 (SIEBERT 1966) inkubiert. Am Ende wurde $MgSO_4$ (5×10^{-3} M) zugegeben (LAMANNA u. MALETTE 1949) und auf 0° C abgekühlt. Das Reaktionsgemisch wurde meistens sofort säulenchromatographisch an MAK aufgetrennt (s.o.). Bei einigen Versuchen wurde lediglich die Menge der säureunlöslich gebundenen ^{32}P-Radioaktivität bestimmt, nachdem zuvor das Reaktionsgemisch mit $HClO_4$ oder Trichloressigsäure versetzt und mit einer Zentrifugation in Sediment und Überstand getrennt worden war.

10. Enzymatischer Abbau mit Desoxyribonuklease (DNase)

Die Inkubation gelöster Nukleinsäuren erfolgte mit 10 bis 20 µg DNase pro ml (in Gegenwart von 5×10^{-3} M $MgSO_4$) bei 37° C für 2,5 bis 3 h. Danach wurde das Reaktionsgemisch im Eisbad rasch abgekühlt und anschließend entweder an MAK chromatographiert oder mit $HClO_4$ bzw. Trichloressigsäure ausgefällt.

11. Dünnschichtchromatographische Trennung von kondensierten anorganischen Phosphaten
PEI-Cellulose

In Trägerplatten (20 x 20 cm) wurden mit der Ionenaustauscher-Cellulose PEI (= Polyäthylenimin; Serva, Heidelberg) für Dünnschichtchromatographie vgl. TANZER, KRICHEVS-

KY u. CHASSY (1968) 250 µ dick beschichtet und im Exsikkator über Trockenmittel aufbewahrt. Die Entwicklung der beschickten Platten erfolgte eindimensional mit Lithiumchlorid (4,0 M); die Laufzeit betrug ca. 1 3/4 h. Die aufgetrennten anorganischen Phosphate wurden nach der Methode von PFRENGLE (1957) durch Anfärben sichtbar gemacht: aufgesprühte Molybdatlösung (Natriummolybdat, Ammoniumnitrat und HNO_3) bildet zunächst mit diesen gelbe Molybdat-Phosphat-Komplexe, welche durch ein anschließend aufgesprühtes Reduktionsmittel (Natriumbisulfit, Natriumsulfit und Methol) in Molybdänblau überführt werden.

Cellulose

Dieses zweidimensionale Verfahren wurde in Anlehnung an RÖSSEL u. KIESSLICH (1967) durchgeführt. Zur Beschichtung der Platten wurde ein Gemisch aus doppelt säuregewaschener Cellulose 142 dg (Schleicher & Schüll, Dassel) und Cellex MX (Bio-Rad, München) im Verhältnis 1:1 verwendet (Schichtdicke 375 µ). Nach Vortrocknen für 20 min. bei Zimmertemperatur wurden die Platten im Trockenschrank bei 100° C 1 h lang behandelt. Die Entwicklung der Platten mit aufgetragener Probe erfolgte zunächst mit einem sauren Fließmittel (1. "MD 2" nach RÖSSEL 1963: 75 ml Methanol p.a.; 20 ml einer Lösung aus 700 ml Isopropanol p.a. und 100 ml dest. H_2O; 25 ml einer Lösung aus 125 g Trichloressigsäure p.a. und 32 ml 25%iger Ammoniaklösung p.a. mit dest. H_2O auf 1 000 ml aufgefüllt; 6 ml einer Lösung aus 200 ml Eisessig 96% p.a. und 800 ml dest. H_2O. 2. "MD 4" nach RÖSSEL u. KIESSLICH (1967): 45 ml Methanol p.a.; 15 ml Dioxan; 10 ml einer Lösung aus 700 ml Isopropanol p.a. und 100 ml dest. H_2O; 5 ml einer Lösung aus 200 ml Eisessig 96% p.a. und 800 ml dest. H_2O; 25 ml einer Lösung aus 125 g Trichloressigsäure p.a. und 32 ml 25%iger Ammoniaklösung p.a. auf 1 000 ml mit dest. H_2O aufgefüllt). Nach Zwischentrocknung wurde sodann in der zweiten Dimension mit einem alkalischen Fließmittel entwickelt ("DA 2" nach RÖSSEL 1963: 67,5 ml Metha-

nol p.a.; 22,6 ml einer Lösung aus 700 ml Isopropanol p.a. und 100 ml dest. H_2O; 50 ml einer Lösung aus 75 g Trichloressigsäure p.a. und 80 ml 25%iger Ammoniaklösung p.a. mit dest. H_2O auf 1000 ml aufgefüllt; 6 ml einer Lösung von 200 ml Eisessig 96% p.a. und 800 ml dest. H_2O). Die Laufzeit für jedes Fließmittelgemisch betrug ca. 1,5 h. Die Identifizierung anorganischer Phosphatverbindungen auf den entwickelten Platten erfolgte auch hier nach der oben beschriebenen Farbreaktion. Die Position ^{32}P-markierter Substanzen wurde durch Autoradiographie bestimmt, indem die Dünnschichtplatten auf Röntgenfilme (Agfa-Gevaert "Curay DW Blue Base") aufgelegt wurden.

12. Chemikalien

Trägerfreies ^{32}P-Orthophosphat kam von The Radiochemical Centre Amersham, England. Sepharose 2 B und QAE-Sephadex A 50 lieferte Pharmacia, Uppsala; RNase (lyophilisiert, phosphatfrei) Worthington Biochemical Corp., USA. Serumalbumin (Rinderserum, Fraktion V) kam von der California Corp. for Biochemical Research, Luzern und Kieselgur ("Hyflo Super-Cel") von Lehmann u. Voss, Hamburg. DNase, Dowex (1 x 2, 200 - 400 mesh, Chloridform), PEI-Cellulose TLC p.a. und sämtliche Celluloseionenaustauscher (DEAE, GE) stammten von der Firma Serva, Heidelberg. Selecta-Cellulose 142 dg (doppelt säuregewaschen) lieferten Schleicher & Schüll, Dassel und Cellex MX (mikrokristalline Cellulose) die Firma Bio-Rad, München. Alle übrigen Chemikalien waren p.a. und kamen von Merck, Darmstadt.

13. Abkürzungen

l RNS	lösliche Ribonukleinsäure
hm RNS_1	hochmolekulare Ribonukleinsäure (16 s)
hm RNS_2	" " (23 s)

DNS	Desoxyribonukleinsäure
Poly-P	linear kondensierte Polyphosphate
Meta-P	cyclisch kondensierte Metaphosphate
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
MAK	methyliertes Serumalbumin + Kieselgur
RNase	Ribonuklease
DNase	Desoxyribonuklease

Ergebnisse

I. Experimentelle Voraussetzungen für eine gezielte ^{32}P-Markierung kondensierter Phosphate

1. Phosphatverarmung

Wie Abb. 1 erkennen läßt, bestimmt die Dauer der vorausgehenden Phosphatverarmung der Algenzellen in entscheidender Weise das Ausmaß des späteren ^{32}P-Einbaues. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen lag das Optimum bei etwa 20 h. Entsprechend wurde für alle Markierungsversuche mit ^{32}P-Orthophosphat diese Zeitdauer der Phosphatverarmung gewählt.

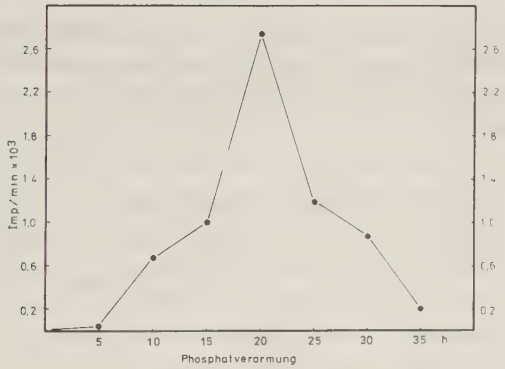

Abb. 1 Abhängigkeit der ^{32}P-Markierung von der Dauer der Phosphatverarmung

2. Zelldichte

Als weiterer Faktor, welcher die ^{32}P-Markierung von kondensierten Phosphaten beeinflußt, wurde die Anzahl der Zellen im Versuchsansatz erkannt. Ihre Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines Photoelementes in Verbindung mit einem Spiegelgalvanometer (vgl. Material und Methoden). Zuneh-

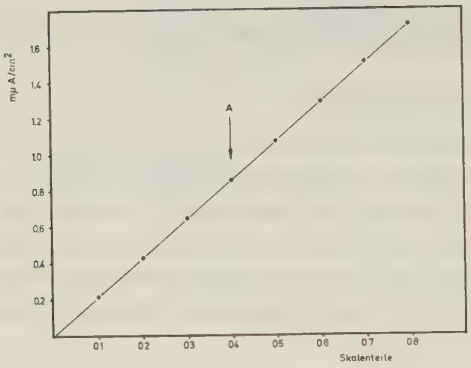

Abb. 2 Eichkurve des Photoelements (Ordinate: reflektiertes und transmittiertes Licht in mμ A/cm^2; Abszisse: Skalenteile auf dem Galvanometer; A: Arbeitspunkt; bei dieser Zelldichte wurden Markierungsexperimente mit ^{32}P-Orthophosphat durchgeführt.

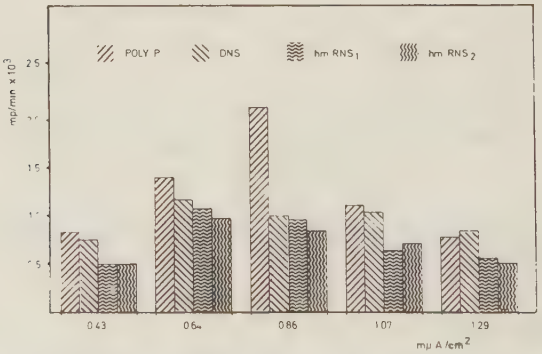

Abb. 3 ^{32}P-Einbau in kondensierte Phosphate und Nukleinsäuren in Abhängigkeit von der Zelldichte (Lichtelektrisch gemessen als mμ A/cm^2.

mende Anzahl von Skalenteilen bedeutet steigender Lichtgenuß für die Zellen, wobei eine lineare Abhängigkeit von ihrer Dichte besteht (Abb. 2). Die Auswirkung unterschiedlicher Zelldichte und damit unterschiedlichen Lichtgenusses pro Zelle auf den Einbau von ^{32}P in die kondensierten Phosphate und in die Komponenten der Nukleinsäuren ist in Abb. 3 dargestellt. Die radioaktive Markierung kondensierter Phosphate erreichte den Optimalwert bei einer Zelldichte, für die der Wert von 0,86 mμ Ampere/cm^2 gemessen wurde. Vergleichsweise enthielten hierbei die Nukleinsäuren relativ wenig Radiophosphor. Bei Abnahme der Zellzahl pro Volumeneinheit verteilte sich die Markierung gleichmäßig auf alle Komponenten der Nukleinsäuren und auf die kondensierten Phosphate.

3. Markierungsdauer

Je kürzer der Kontakt der Zellen mit dem ^{32}P-Orthophosphat war, umso intensiver und exklusiver erfolgte die ^{32}P-Markierung von kondensierten Phosphaten (Abb. 4), während für die Nukleinsäuren nur ein relativ geringer Einbau typisch war. Aus diesem Grunde wurde die Inkubationsdauer bei allen Experimenten auf 1 min. begrenzt. Bei Verlängerung der Inkubationsdauer verstärkte sich der Einbau von ^{32}P in die Komponenten der Nukleinsäuren stetig, während er bei den kondensierten Phosphaten im wesentlichen gleichblieb. Auffällig ist die unverhältnismäßig starke Markierung der DNS bei einer Markierungszeit von 10 und 30 min.

4. Konzentration von ^{32}P-Orthophosphat

Wie Abb. 5 zeigt, beeinflußt auch die Menge des im Kurzzeitmarkierungsexperiments (1 min.) eingesetzten ^{32}P-Orthophosphats den Einbau von Radiophosphor in kondensierte Phosphate und Nukleinsäuren. Als Optimalkonzentration für kondensierte Phosphate wurden ca. 17,5 μC/ml ermittelt; bei

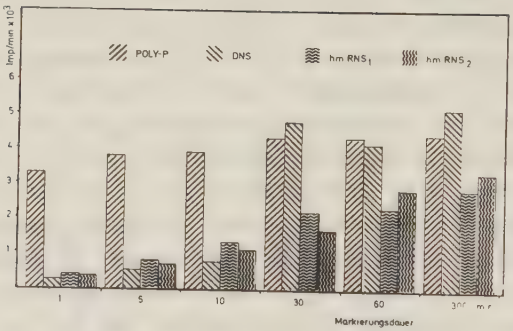

Abb. 4 ^{32}P-Einbau in kondensierte Phosphate und Nukleinsäuren bei unterschiedlich langer Inkubation der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat.

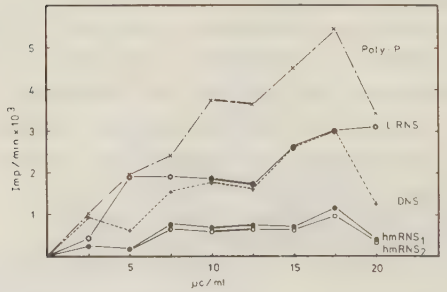

Abb. 5 Abhängigkeit des ^{32}P-Einbaues in kondensierte Phosphate und Nukleinsäuren von der Menge des eingesetzten ^{32}P-Orthophosphats.

einem Angebot von 20 µC/ml und mehr verschlechtert sich offensichtlich die Aufnahme bzw. Verwertung von ^{32}P-Orthophosphat durch die Zellen im Licht. Auf Grund des bevorzugten Einbaues in kondensierte Phosphate im Vergleich zu den Nukleinsäuren, wurde für die Versuche eine Menge von 10 µC/ml gewählt.

II. Identifizierung der schnellmarkierten Phosphorverbindungen

Erste Hinweise zur chemischen Natur der ^{32}P-markierten produkte, die sich bei MAK-Chromatographie wie die Nukleinsäuren verhielten, aber nicht mit ihnen identisch waren, erbrachten einige qualitative Testreaktionen. Sie wurden mit dem Material durchgeführt, daß laut Eluierungsdiagramm in den Fraktionen zwischen löslicher RNS und DNS angereichert vorlag (vgl. Abb. 7 Seite 20).

1. Anfärbung mit Toluidinblau

Wurde eine Probe mit einer 0,003%igen Toluidinblaulösung versetzt, so trat der bekannte "metachromatische Effekt" (Verschiebung des Absorptionsmaximums von 630 nm nach 530 nm) sehr schnell ein (WIAME 1947; DAMLE u. KRISHNAN 1954; TEWARI u. KRISHNAN 1959; MEHROTRA u. GUPTA 1964). Vorhandene Nukleinsäuren störten diese Reaktionen nicht, da sie mit Toluidinblau keinen typischen Farbkomplex eingehen.

2. RNase und DNase-Behandlung

Inkubation der ^{32}P-markierten Produkte mit einer Mischung von RNase und DNase und anschließende Auftrennung der Reaktionsprodukte an einer MAK-Säule (Abb. 6) bewirkte zwar den völligen Abbau der Nukleinsäuren, aber die schnellmarkierten Phosphatverbindungen in ihrer typischen Position mit dem Profil der Radioaktivität erschienen (Anrei-

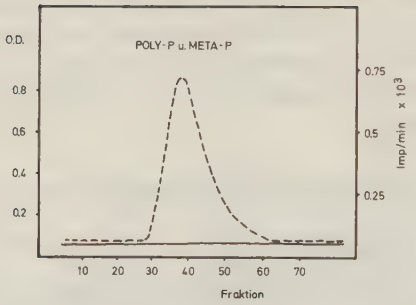

Abb. 6 Säulenchromatographische Trennung des Reaktionsgemisches an MAK nach Behandlung der isolierten Nukleinsäuren mit RNase und DNase. - - - : ^{32}P-Radioaktivität; - - - : UV-Absorption bei 254 nm.

cherung maximal in den Fraktionen 37/39) weiterhin im Eluierungsdiagramm. Die nachgewiesene Resistenz gegen die beiden Enzyme des Nukleinsäureabbaues beweist, daß die Verbindungen mit der höchsten ^{32}P-Markierung offensichtlich nicht mit Nukleinsäuren identisch sind oder solche als wesentliche Bestandteile enthalten.

3. Saure Hydrolyse

Behandlung der ^{32}P-markierten Produkte mit 1 N HCl für 7 min. bei 100° C führte zur Freisetzung großer Mengen an ^{32}P-Orthophosphat. Auch dieses Verhalten spricht dafür, daß die schnellmarkierten Phosphorverbindungen zum überwiegenden Teil aus kondensierten anorganischen Phosphaten bestehen; sie wären damit den sogenannten "7-Minuten-Phosphaten" zuzuordnen. Allerdings verläuft diese saure Hydrolyse nicht vollständig; außerdem werden auch die Nukleinsäuren zum Teil hydrolysiert (WIAME 1947; EBEL 1952).

4. Fällung mit Barium

Als 4. Hinweis für das Vorliegen von kondensierten anorganischen Phosphaten diente die erfolgreiche Ausfällung der ^{32}P-markierten Produkte mit einer 10%igen $BaSO_4$-Lösung. Allerdings ist der Aussagewert dieser Reaktion kein ausreichendes Kriterium für hochmolekulare Polyphosphate (vgl. THILO u. Mitarbeiter 1956).

Obwohl die 4 Testreaktionen auf kondensierte anorganische Phosphate positiv ausfielen, waren Aussagen über die Zusammensetzung und chemische Natur der Ersteren erst möglich, als ein Verfahren zur Extraktion und Reinigung erarbeitet worden war. Hierüber wird anschließend berichtet.

III. Isolierung und Reinigung ^{32}P-markierter kondensierter Phosphate

1. Säulenchromatographie an MAK

Mit der bereits früher gemachten Erfahrung, wonach ^{32}P-markierte kondensierte Phosphate bei der Isolierung der Nukleinsäuren aus Zellhomogenaten anfallen, wenn diese einer Phenolbehandlung unterzogen werden (vgl. Abschnitt 3 "Material und Methoden", war eine praktikable Technik für die erste Stufe der Gewinnung markierter kondensierter Phosphate gegeben. Das nach Alkoholzusatz aus der wässrigen Phase gewonnene Präzipitat enthielt neben den Nukleinsäurekomponenten auch die ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate, wie aus der nachfolgenden säulenchromatographischen Trennung dieser Fällung an MAK deutlich wird (Abb. 7). Im resultierenden Eluierungsdiagramm besitzt das Profil der Radioaktivität ein Hauptmaximum zwischen den Absorptionsmaxima von löslicher RNS und DNS, welches für ^{32}P-markierte kondensierte Phosphate typisch ist. Im Vergleich dazu ist die ^{32}P-Markierung der ribosomalen 16 S- und 23 S-Komponenten relativ gering. Eine erste Trennung der anorganischen Phosphate von der ribosomalen RNS wird mit dieser Technik erreicht.

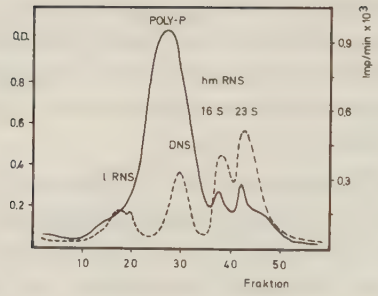

Abb. 7 Fraktionierung der Gesamtnukleinsäuren aus phosphatverarmten Zellen von Anacystis nidulans an MAK nach Markierung mit ^{32}P-Orthophosphat für 1 min. ----- : ^{32}P-Radioaktivität in Imp./min; - - - : UV-Absorption bei 254 nm.

Das Ziel des experimentellen Weges, der anschließend beschritten wurde, bestand darin, die bei der MAK-Säulenchromatographie in die Phosphatfraktion gelangten Anteile der löslichen RNS und der DNS quantitativ zu entfernen. Hier lag zunächst eine der Hauptschwierigkeiten, deren Bewältigung mit mehreren unterschiedlichen Methoden versucht wurde. Weder Rechromatographie an MAK mit veränderten Konzentrationsgradienten, noch zusätzlich durchgeführte fraktionierende Zentrifugationen des Zellhomogenates bzw. der Fraktion der Gesamtnukleinsäuren, brachte befriedigende Ergebnisse in dieser Richtung. Ebenso erfolglos erwies sich eine Gelfiltration an Sepharose. In einer weiteren Serie von Experimenten wurde die Brauchbarkeit von Cellulose-Ionenaustauschern (DEAE, CM, SE, Hydroxylapatit) für die Entfernung von Nukleinsäuren aus der Lösung der angereicherten markierten Phosphate überprüft. Erste posi-

tive Ergebnisse hinsichtlich des erwünschten Trenneffekts ergaben sich bei der Säulenchromatographie an GE-Cellulose (Guanidoäthyl-Cellulose), einem stark basischen Anionenaustauscher. Dabei wurden die kondensierten Phosphate etwas früher als die lösliche RNS von der Säule eluiert; eine vollständige Abtrennung konnte jedoch nicht erzielt werden. Offensichtlich waren hierfür die basischen Eigenschaften der GE-Cellulose nicht ausreichend.

2. Säulenchromatographie an QAE-Sephadex A 50

Auf Grund der positiven Erfahrungen, die mit dem basischen Celluloseaustauscher GE gemacht wurden, schien die Anwendung eines vollquarternären Ionenaustauschers angezeigt. Hierfür bot sich QAE-Sephadex A 50 (Chloridform) auf Grund seiner Eigenschaften an. Tatsächlich gelang eine Trennung von ^{32}P-markierten Phosphaten und den begleitenden Nukleinsäurekomponenten der löslichen RNS und der DNS. Die entsprechenden Eluatfraktionen der vorausgegangenen MAK-Säulenchromatographie (s. Abb. 7) wurden vereinigt und an einer Säule aus QAE-Sephadex A 50 adsorbiert. Unter Einwirkung eines logarithmischen Konzentrationsgradienten von 0,1 M gegen 1,0 M NaCl in Phosphatpuffer (0,05 M; pH 6,7) wandern die ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate vor der löslichen RNS und der DNS von der Säule. Erstere sind durch das hohe Maximum der ^{32}P-Radioaktivität, die mit keiner UV-Absorption koinzidiert, charakterisiert (Abb. 8). Die zugehörigen Eluatfraktionen wurden vereinigt und 12 h gegen bidest. H_2O dialysiert. Das nach Einengung im Rotationsverdampfer anfallende Konzentrat (ca. 1 ml) diente als Ausgangsmaterial zur Charakterisierung der isolierten ^{32}P-markierten Phosphate.

3. Modifizierte Säulenchromatographie an MAK

Ein anderer methodischer Weg zur Abtrennung anorganischer Phosphate von den Nukleinsäuren war eine Abänderung

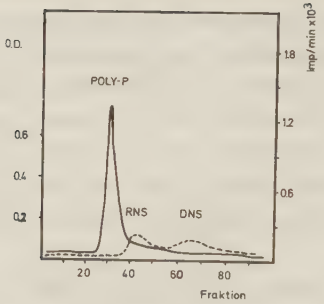

Abb. 8 Säulenchromatographie der über MAK angereicherten ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate an QAE-Sephadex A 50. ----- : ^{32}P-Radioaktivität in Imp./min.; - - - : UV-Absorption bei 254 nm.

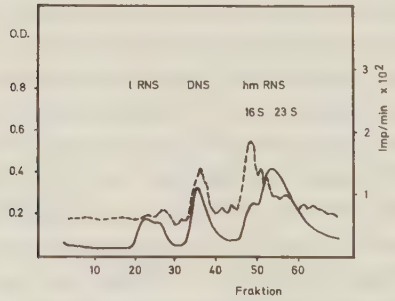

Abb. 9 Modifizierte Säulenchromatographie von Gesamtnukleinsäuren und kondensierten Phosphaten an MAK. Erste Eluierung mit einem logarithmischen Konzentrationsgradienten von 0,1 M gegen 1,5 M NaCl ohne Phosphatpuffer. - - - : ^{32}P-Radioaktivität in Imp./min.; ----- : UV-Absorption bei 254 nm.

der typischen Säulenchromatographie an MAK. Interessanterweise verhalten sich dabei die einzelnen Nukleinsäuren nicht einheitlich. Bei diesem Verfahren wird die wie üblich beladene MAK-Säule zunächst mit einem logarithmischen Konzentrationsgradienten von 0,1 M gegen 1,5 M NaCl entwickelt, wobei jedoch kein Phosphat zur Pufferung und pH-Stabilität zugesetzt wird. Wie das Eluierungsdiagramm (Abb. 9) zeigt, wandern zwar die meisten Nukleinsäurekomponenten von der Säule; hingegen fehlt das typische Radioaktivitätsmaximum der ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate. Die Markierung der Nukleinsäuren, vor allem der ribosomalen Komponenten, unterliegt einigen von der Norm abweichenden Veränderungen (vgl. Abb. 11 Seite 24). So fehlt beispielsweise der typische Radioaktivitätsgipfel, welcher im Normalfall der 23 S-Komponente zugeordnet ist. Außerdem läßt das Profil der UV-Absorption erkennen, daß die Maxima der ribosomalen 16 S- und 23 S-Komponente deutlich erniedrigt sind. Offensichtlich werden sie unter den veränderten Bedingungen nur unvollständig von der Säule eluiert.

Nach Beendigung des Eluierungsvorganges wurde die Säule zur Entfernung des überschüssigen NaCl mit einer phosphatfreien 0,1 M Lösung des gleichen Salzes gründlich gewaschen. Nun schloß sich eine zweite Eluierung der Säule mit dem normalen, d.h. dem phosphatgepufferten NaCl-Gradienten (0,1 M gegen 1,5 M NaCl in 0,05 M Phosphat; pH 6,7) an. Wie das Eluierungsdiagramm dieser zweiten Entwicklung der Säule zeigt (Abb. 10), erscheinen in den ersten Fraktionen (1 - 25) ^{32}P-markierte Phosphate, gekennzeichnet durch das hohe Maximum der Radioaktivität, das mit keinem der UV-Absorption koinzidiert. Es folgen geringe Mengen an DNS und Komponenten der hochmolekularen RNS, die entsprechend ihren Absorptionsmaxima nur einen geringen Anteil der Gesamtnukleinsäuren darstellen.

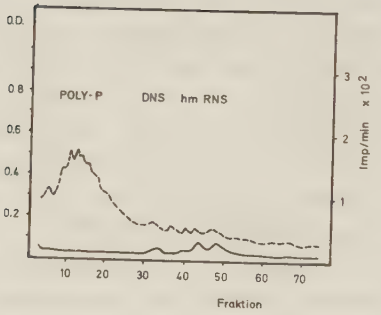

Abb. 10 Modifizierte Säulenchromatographie von Gesamtnukleinsäuren und kondensierten Phosphaten an MAK. Zweite Eluierung mit einem normalen logarithmischen Konzentrationsgradienten von 0,1 M gegen 1,5 M NaCl im Phosphatpuffer. - - - : ^{32}P-Radioaktivität in Imp./min.; ----- : UV-Absorption bei 254 nm.

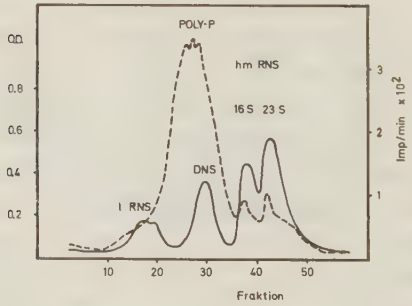

Abb. 11 Kontrollversuch zu den in Abb. 9 und Abb. 10 dargestellten Experimenten. Eine gleichgroße Menge (2 000 γ) des dort verwendeten Ausgangsmaterials wurde einer normalen säulenchromatographischen Trennung an MAK unterworfen. - - - : ^{32}P-Radioaktivität in Imp./min.; ----- : UV-Absorption bei 254 nm.

Die Fraktionen 1 bis 25 wurden vereinigt und 12 h gegen bidest. H_2O dialysiert. Das nach Einengen gewonnene Konzentrat (ca. 1 ml) diente wiederum als Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen.

Ein Kontrollversuch, bei dem eine gleichgroße Menge desselben Ausgangsmaterials normal an MAK chromatographiert wurde (Abb. 11) macht deutlich, daß bei der oben beschriebenen modifizierten zweifachen Eluierung ein deutlicher Verlust an ^{32}P-Radioaktivität zu verzeichnen ist. Er beruht vermutlich auf einer durch pH-Veränderungen bedingten, irreversiblen Bindung von markierten anorganischen Phosphaten an die Säulenmasse. Aus diesem Grunde ist diese Methode zur Isolierung von kondensierten Phosphaten nur bedingt geeignet. In wieweit sie neue Möglichkeiten zur Fraktionierung von Nukleinsäuren bietet, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

IV. Identifizierung der schnellmarkierten kondensierten Phosphate

Im Hinblick auf die Erfahrungen anderer Autoren, die vor allem bei der Auftrennung von kondensierten Phosphaten nicht biologischer Herkunft gewonnen wurden, erschien die dünnschichtchromatographische Auftrennung der ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate an reiner und modifizierter Cellulose erfolgversprechend.

1. Dünnschichtchromatographie an PEI-Cellulose

Die Trennung kondensierter Phosphate an mikrokristalliner Cellulose, die mit Polyäthylenimin imprägniert ist, erlaubt nur begrenzte Aussagen über das Vorliegen von kurz-, mittel- und langkettigen kondensierten Verbindungen. Ihre Identifizierung ist daher nur mit Hilfe von Vergleichssubstanzen mit einer definierten Kettenlänge möglich; leider standen solche nicht zur Verfügung.

Verwendet wurde 4,0 M Lithiumchlorid als Entwicklerlösung. Diese Molarität wurde gewählt, weil sie eine Auftrennung vor allem von hochkondensierten Phosphaten am ehesten erwarten ließ. Erfahrungsgemäß erhöht sich mit steigender Konzentration an Lithiumchlorid ihre Beweglichkeit an PEI-Cellulose. Die nach Vorreinigung über MAK bzw. QAE-Sephadex vorliegenden ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate aus Anacystis ergaben im Autoradiogramm 4 Flecke mit ^{32}P-Radioaktivität. Von diesen enthält vermutlich die unmittelbar an der Laufmittelfront liegende Zone die Oligophosphate. Die Hauptmasse der Radioaktivität findet sich im Startfleck; sie ist offensichtlich Bestandteil der langkettigen kondensierten Phosphate, welche sich durch völlige Unbeweglichkeit in der PEI-Cellulose auszeichnen. Die beiden übrigen Zonen der Radioaktivität werden von mittelkettigen Phosphaten gebildet, deren Molekülgröße nur geschätzt werden kann.

2. Rechromatographie an QAE-Sephadex A 50

Neben der Dünnschichtchromatographie an PEI-Cellulose wurde eine Auftrennung der vorgereinigten markierten

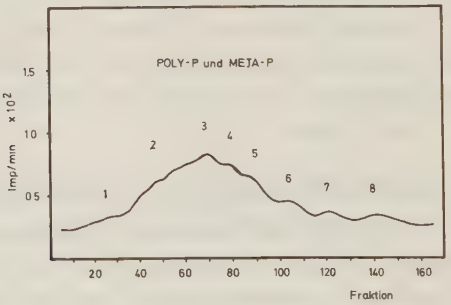

Abb. 12 Fraktionierung eines Gemisches aus ^{32}P-markierten Poly- und Metaphosphaten durch Säulenchromatographie an QAE-Sephadex. Eluierung mit einem log. Konzentrationsgradienten von 0,2 gegen 0,4 M NaCl im Phosphatpuffer.

kondensierten Phosphate an QAE-Sephadex unter Variierung des Gradienten versucht. Die Entwicklung einer beladenen Säule führte zu einer unvollständigen Auftrennung der kondensierten Phosphate. Wie das Profil der Radioaktivität zeigt (Abb. 12) erscheinen mindestens 8 Fraktionen. Sie sind allerdings nicht deutlich voneinander abgesetzt, wofür vermutlich die geringfügigen Unterschiede in der Kettenlänge verantwortlich sind.

Die Säulenchromatographie an QAE-Sephadex A 50 erbringt demgemäß eine partielle Auftrennung der verschiedenartigen kondensierten Phosphate. Inwieweit es sich dabei um echte Fraktionen derselben handelt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

3. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie an Cellulose

A. Kondensierte ^{32}P-Phosphate von der Eluat-Fraktion nach modifizierter MAK

Das Ergebnis einer zweidimensionalen dünnschichtchromatographischen Trennung der ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate, die durch eine modifizierte MAK-Säulenchromatographie von den Nukleinsäuren abgetrennt wurden (Abb. 13), entspricht qualitativ dem, welches für die über QAE-Sephadex vorgereinigte Fraktion erhalten wurde. Lediglich die radioaktive Markierung der Metaphosphate und der hochmolekularen Kondensate ist, im Vergleich zur Kontrolle (Sephadex-Eluat) geringer (Abb. 14). Der mit der modifizierten MAK-Trennung verbundene relativ starke Verlust der markierten hochmolekularen kondensierten Phosphate war bereits in den Abb. 10 und 11 (Seite 25) zutage getreten. Abgesehen davon, besteht aber der Vorteil dieser Methodik darin, daß neben den kondensierten Poly- und Metaphosphaten offensichtlich andere ^{32}P-markierte Verunreinigungen (z.B. phosphorylierte Zucker) fehlen.

Abb. 13 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate, die durch modifizierte Säulenchromatographie an MAK vorgereinigt wurden; arabische Zahlen: ^{32}P-Polyphosphate; römische Zahlen : Metaphosphate; jeweils nach deren Phosphorsäure-Resten gekennzeichnet.

Abb. 14 Kontrolle zum Versuch der Abb. 13. Eine identische Probe des gleichen Ausgangsmaterials (nach Phenolbehandlung und Alkoholfällung), jedoch über normale MAK- und QAE-Sephadex-Chromatographie isoliert, wurde dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

B. Zusammensetzung der kondensierten ^{32}P-Phosphate nach Vorreinigung über QAE-Sephadex A 50

Das in Abb. 15a wiedergegebene Autoradiogramm einer zweidimensionalen Auftrennung der vorgereinigten ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate zeigt deutlich, daß sie sich aus verschiedenen Komponenten zusammensetzen. Die stärkste Markierung findet sich am Startfleck, wo typischerweise kondensierte Produkte aus mehr als 10 Phosphorsäure-Resten liegen bleiben. Hieraus wird deutlich, daß die aus Anacystis nidulans isolierten ^{32}P-Phosphate zum größten Teil als langkettige Kondensate vorliegen. Hingegen handelt es sich bei den bevorzugt vom sauren Laufmittel aufgetrennten und relativ schwach markierten Verbindungen um linear kondensierte Polyphosphate aus 2 bis 7 Phosphorsäure-Resten. Nach ihrer Anzahl sind die zugehörigen Schwärzungsflecke der einzelnen Verbindungen mit arabischen Zahlen im Autoradiogramm bezeichnet.

Die anschließende Entwicklung der Dünnschichtplatte mit einem alkalischen Laufmittel in der zweiten Dimension (Versetzung um 90° gegenüber der ersten Laufrichtung) brachte die Abtrennung der ringförmig kondensierten Phosphate, der sogenannten Metaphosphate, von den kettenförmig kondensierten. Entsprechend der Anzahl der am Aufbau beteiligten Phosphorsäure-Reste sind die zugehörigen Schwärzungsflecke mit römischen Ziffern bezeichnet. Nicht nur das Auftreten von 4 verschiedenen Metaphosphaten ist überraschend, sondern auch ihre unterschiedliche radioaktive Markierung. Sie ist am stärksten im Trimetaphosphat (III) und relativ am schwächsten im Tetra- und Hexametaphosphat (IV und VI), während das Pentaphosphat (V) eine Zwischenstellung einnimmt. Die Ursachen für dieses Markierungsmuster sind wohl in erster Linie in einer unterschiedlichen metabolischen Aktivität der einzelnen Verbindungen zu sehen.

Abb. 15a Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie vorgereinigter ^{32}P-markierter anorganischer Phosphate (Sephadex-Eluat). 1.Dimension (Ordinate): saures Lösungsmittel; 2.Dimension (Abszisse): alkalisches Lösungsmittel; 2 - 7: linear kondensierte Oligophosphate mit 2 bis 7 Phosphorsäure-Resten; III - VI: ringförmig kondensierte Metaphosphate mit 3 bis 6 Phosphorsäure-Resten.

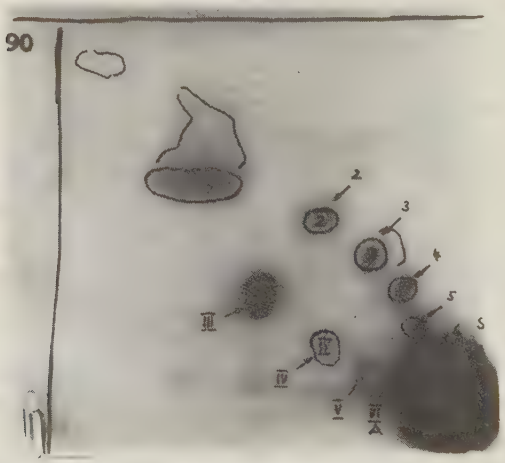

Abb. 15b Wie unter 15a; zusätzlich ist die Position der angefärbten Vergleichssubstanzen (arabische und römische Zahlen innerhalb schwarzer Kreise) angegeben.

Methodisch ist zu ergänzen, daß den Proben der ^{32}P-markierten kondensierten Phosphaten vor dem Auftragen auf die Dünnschichtplatte unmarkierte Vergleichssubstanzen zugesetzt wurden. Durch die Kongruenz der ^{32}P-markierten Flecken mit den unmarkierten Vergleichssubstanzen konnten die Kondensationsgrade der linearen und cyclischen ^{32}P-Oligophosphate nach der Autoradiographie identifiziert werden. Abb. 15b zeigt, daß eine Anzahl von Schwärzungsflecken auf dem Röntgenfilm mit den Farbflecken der zugesetzten Vergleichssubstanzen auf der Dünnschichtplatte (schwarz umrandet) zur Deckung gebracht werden können.

Bedingt durch den Kondensationsgrad der einzelnen Phosphate, ergibt sich eine charakteristische Position im zweidimensional entwickelten Dünnschichtchromatogramm. Nach GRUNZE u. THILO (1955) zeigen die Oligophosphate mit steigender Kettenlänge einen exponentiellen Abfall der Rf-Werte, wobei alle Verbindungen mit mehr als 10 Phosphorsäure-Resten in unmittelbarer Nachbarschaft des Startpunktes verbleiben. Diese Gesetzmäßigkeit gilt auch für die hier vorgelegten Autoradiogramme (vgl. Abb. 15a und 15b).

Aus Abb. 15a und 15b geht außerdem hervor, daß im aufgetragenen Gemisch neben den markierten kondensierten Phosphaten auch noch andere ^{32}P-markierte Substanzen enthalten waren. So tritt im Bereich des anorganischen Phosphats ein deutlicher Schwärzungsfleck auf. Da die aufgetragene Probe zuvor einer Dialyse unterworfen worden war, kann es sich bei der Masse der an dieser Stelle radioaktiven Produkte nur zu einem geringen Prozentsatz um ^{32}P-Orthophosphat handeln. Zur Entfernung jener Verbindungen (vermutlich Zuckerphosphate), die etwa den gleichen Rf-Wert wie Orthophosphat besitzen, wurden Proben des gleichen Ausgangsmaterials mit Norit A behandelt. Nach zweidimensionaler Trennung des Norit-Überstandes auf der Dünnschichtplatte (Abb. 16a und 16b) war jedoch festzustellen, daß entgegen der Erwartung 3 Schwärzungsflecke im Bereich des Orthophosphates auftraten.

Abb. 16a Dünnschichtchromatographische Trennung der vorgereinigten Poly- und Metaphosphate (vgl. Abb. 15a) nach Norit-Behandlung; arabische Zahlen: linear kondensierte Polyphosphate; römische Zahlen: cyclische Metaphosphate.

Abb. 16b Wie 16a, zusätzlich ist die Position der angefärbten Vergleichssubstanzen (Zahlen innerhalb schwarzer Kreise) angegeben.

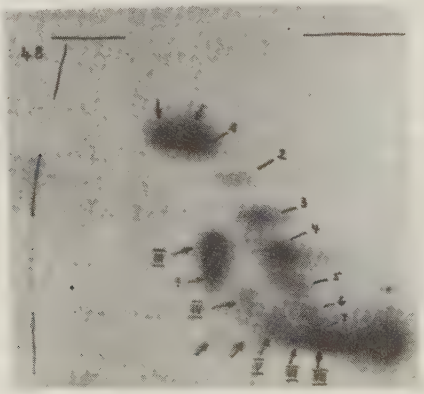

Abb. 17 Wie Abb. 16a, jedoch Kontrollversuch ohne vorherige Norit-Behandlung.

Letzteres war unmarkiert als Vergleichssubstanz cochromatographiert worden. Die chemische Natur der 3 Verbindungen, die sich oberhalb der Position des Orthophosphates anreichern, ist noch unbekannt; offensichtlich können sie nicht quantitativ an Norit adsorbiert werden. Dieser Effekt war hingegen für einen Teil der hochkondensierten Phosphate zu beobachten. Ein Vergleich zwischen einer Norit-behandelten und einer unbehandelten Probe des gleichen Ausgangsmaterials macht dies deutlich: sowohl am Startpunkt des Dünnschichtchromatogramms als auch in den Flecken der Oligophosphate findet sich für die unbehandelte Kontrolle weitaus mehr Radioaktivität (Abb. 17).

Durch die weitgehende Entfernung der hochmolekularen kondensierten Phosphate durch Norit, können jetzt auch die nur geringfügig gewanderten Oligophosphate höherer Ordnung im Autoradiogramm besser erkannt werden. So erscheint neben den Tri- bis Hexametaphosphaten (III bis VI) auch noch das Heptametaphosphat (VII) als distingter Schwärzungsfleck (vgl. Abb. 16a).

Während das spurenweise Auftreten von ^{32}P-Orthophosphat im Chromatogramm durch die Gegebenheiten der Extraktion und der vorausgegangenen Dialyse bedingt ist, kann das Fehlen größerer Mengen an ^{32}P-Diphosphat (Pyrophosphat) nicht ohne weiteres erklärt werden. Gerade dem Diphosphat wird neuerdings eine Schlüsselstellung im Stoffwechsel zugeschrieben. BALTSCHEFFSKY (1967) spricht von dem anorganischen Diphosphat als dem "Energiedonator" für den photosynthetischen Elektronentransport bei der Phosphorylierung. Andere Autoren berichteten von Austauschreaktionen zwischen dem ATP und dem Diphosphat (BACHOFEN u. SPECHT-JÜRGENSEN 1967; SPECHT-JÜRGENSEN u. BACHOFEN 1968; BACHOFEN, LUTZ u. SPECHT-JÜRGENSEN 1968a und b). Außerdem weiß man, daß das Trimetaphosphat in vitro und vermutlich auch in vivo über lineares Tripolyphosphat sehr schnell in Ortho- und Diphosphat aufgespalten wird (THILO 1955, 1959).

Aus diesen Gründen wurde die Möglichkeit geprüft, ob irgendwo im Verlauf der Reinigungsprozedur kondensierte Phosphate, vor allem aber ^{32}P-Orthophosphat und ^{32}P-Diphosphat verloren gegangen waren. Das Interesse konzentrierte sich zunächst auf den Vorlauf, welcher bei der MAK-Säulenchromatographie auftritt und relativ viel Radioaktivität enthält. Wurden Proben desselben durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie aufgetrennt, so zeigte es sich, daß tatsächlich schon im Vorlauf markierte kondensierte Phosphate die MAK-Säule vorzeitig verlassen (Abb. 18). Neben markierten Tri-, Tetra- und Pentapolyphosphaten treten vor allem Orthophosphat und Diphosphat mit relativ starker ^{32}P-Markierung auf. Hingegen sind keine Metaphosphate nachweisbar. Auf Grund dieses Befundes wird der nachweislich relativ geringe Anteil an ^{32}P-Diphosphat in der Gesamtfraktion der gereinigten Poly- und Metaphosphate verständlich.

Abb. 18 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie des Vorlaufes bei der MAK-Chromatographie isolierter Nukleinsäuren und markierter kondensierter Phosphate; arabische Zahlen geben die Position linearer ^{32}P-Polyphosphate entsprechend der Anzahl der Phosphorsäure-Reste an.

V. Vergleich mit konventionellen Extraktionsmethoden

Die neuentwickelte Methode zur Isolierung kondensierter Phosphate erlaubt zumindest in qualitativer Hinsicht einen Vergleich mit den Ergebnissen der konventionellen Extraktionsmethoden dieser Verbindungen aus pflanzlichen Organismen. So wurde zum Vergleich die von KANAI u. Mitarb. (1965) beschriebene Methode bei Zellen von Anacystis nidulans nach Kurzzeit-Markierung mit ^{32}P-Orthophosphat durchgeführt. Dabei galt es zu überprüfen, ob auch hier jene 4 Polyphosphat-Fraktionen, nämlich Poly-Pi "A" "B" "C" "D", auftreten, die von den Autoren in Zellen von Chlorella gefunden wurden.

Abb. 19 zeigt die dünnschichtchromatographische Auftrennung der extrahierten Polyphosphate, welche in der sogenannten "säurelöslichen Fraktion" auftreten. Letztere wurde von KANAI u. Mitarb. als Poly-Pi "A" bezeichnet. Da bei der eindimensionalen Trennung auf der Dünnschichtplatte eine eindeutige Zuordnung der ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate, vor allem der Metaphosphate, kaum möglich war, wurden Proben der gleichen Fraktion zweidimensional aufgetrennt. Enthielten die ersteren eine nicht zu hohe Gesamtaktivität an ^{32}P, so resultierten optimale Trennungen. Abb. 20 zeigt den überraschenden Befund, wonach in dieser Fraktion "Poly-Pi "A" nur Poly-Phosphate mit maximal 5 Phosphorsäure-Resten nachweisbar sind. Am Startfleck findet sich keinerlei Radioaktivität und damit auch kein kondensiertes Phosphat hochmolekularer Natur. Bei der aus Zellen von Chlorella extrahierten Fraktion Poly-Pi "A" sollen jedoch kondensierte Phosphate mit ca. 20 Phosphorsäure-Resten vorhanden sein (AOKI u. MIYACHI 1964). Neben phosphorylierten Zuckern, die in der säurelöslichen Fraktion teilweise in relativ großer Zahl vorhanden sind (vgl. SAVIOJA u. MIETTINEN 1966) ist auch im entsprechenden Extrakt aus Kurzzeit-markierten Zellen von Anacystis ^{32}P-Trimetaphosphat nachweisbar.

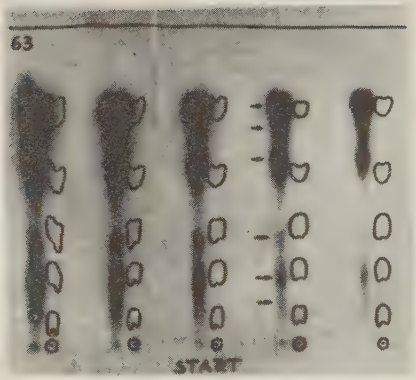

Abb. 19 Dünnschichtchromatographie von Poly-Pi "A" (säurelösliche Fraktion). Die Vergleichssubstanzen (helle Flecken) wurden mit den Proben zusammen chromatographiert; der besseren Orientierung wegen, wurden ihre Flecke seitlich zur Laufrichtung versetzt Reihenfolge der Flecke (vom Startfleck in Laufrichtung): Tetra-, Trimetaphosphat, Tri-, Dipolyphosphat, Orthophosphat). Entwicklung mit saurem Lösungsmittel.

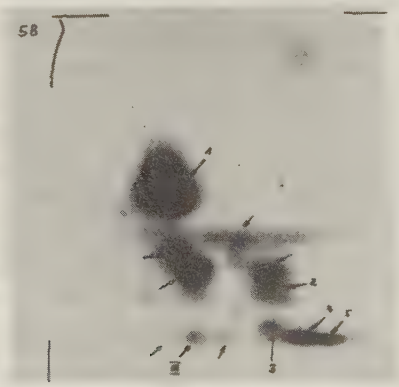

Abb. 20 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der säurelöslichen Fraktion (Poly-Pi "A"); arabische Zahlen: Polyphosphate; römische Zahlen: Metaphosphate; Ordinate: saure, Abszisse: alkalische Laufmittelrichtung.

Bei Chlorella stehen den säurelöslichen Phosphaten die säureunlöslichen Fraktionen der kondensierten Phosphate gegenüber. Zu den letzteren gehören die Fraktionen Poly-Pi "B" "C" und "D". In Poly-Pi "B", der Fraktion die bei alkalischer Extraktion (pH 9) der Zellen anfällt, gelangen offensichtlich die meisten Substanzen mit ^{32}P-Markierung. Nach eindimensionaler Auftrennung zeigt das Autoradiogramm (Abb. 21) mindestens 11 Schwärzungsflecke, die zum Teil nur schlecht voneinander getrennt sind. An diesem Beispiel wird besonders deutlich, daß eine eindeutige Identifizierung aller auftretenden ^{32}P-markierten Verbindungen mit Hilfe der eindimensionalen Dünnschichtchromatographie nicht zu erreichen ist. Im zweidimensional entwickelten Chromatogramm (Abb. 22) erhöht sich nunmehr die Anzahl der Schwärzungsflecke auf 14, von denen lediglich 7 Flecke von markierten kondensierten Phosphaten herrühren: Orthophosphat, Di-, Tetra-, Penta- und Hexapolyphosphat, sowie Tri- und Tetrametaphosphat, letzteres allerdings nur andeutungsweise.

In der Fraktion Poly-Pi "B" konnten KANAI, AOKI u. MIYACHI (1965) auch bei Chlorella keine Metaphosphate nachweisen. Allerdings fanden sie darin hochmolekulare kondensierte Phosphate, welche am Startfleck liegen blieben. Im Gegensatz dazu, fehlten in der pH 9-Fraktion aus Anacystis Kondensate mit mehr als 6 Phosphorsäure-Resten. Diese Verbindungen gelangen erst bei einer Behandlung der Zellen mit 2 N KOH in Lösung. Diese "konzentrierte Alkali"-Fraktion wurde gemäß den Angaben der oben zitierten Autoren in 2 gleichgroße Proben geteilt; die eine Hälfte wurde mit Trichloressigsäure (TCA), die zweite mit Perchlorsäure (PCA) neutralisiert. Hierbei bleiben im ersten Falle die beiden Fraktionen Poly-Pi "C" und "D" in Lösung.

Die eindimensionale Dünnschichtchromatographie dieses Extraktes nach Neutralisation mit TCA (Abb. 23) erbrachte

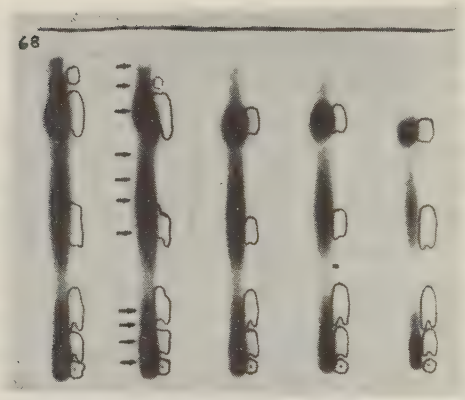

Abb. 21 Dünnschichtchromatographische Trennung von Poly-Pi "B" (pH 9-Fraktion). Vergleichssubstanzen (Reihenfolge vom Start nach oben): hochmolekulare kondensierte Phosphate, Tetra-, Trimetaphosphat, Dipolyphosphat und Orthophosphat. Entwicklung mit saurem Lösungsmittel.

Abb. 22 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der pH 9-Fraktion (Poly-Pi "B"); arabische Zahlen: Polyphosphate; römische Zahlen: Metaphosphate; Ordinate: Laufmittel des sauren, Abszisse: des alkalischen Lösungsmittels.

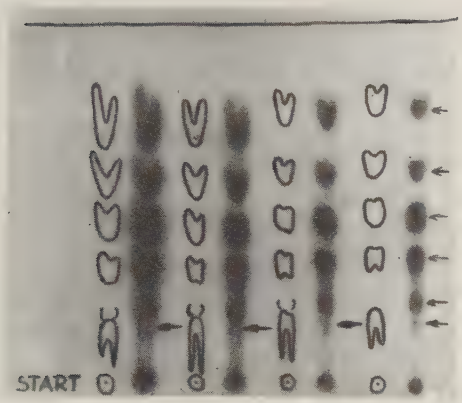

Abb. 23 Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Poly-Pi "C" und "D" ("konz. Alkali"-Fraktion nach TCA-Neutralisation) mit einem sauren Fließmittelgemisch. (Vergleichssubstanzen: unter Abb. 21 erläutert). Zur besseren Auflösung der Schwärzungsflecken wurden auf die gleiche Platte unterschiedliche Mengen aufgetragen und chromatographiert.

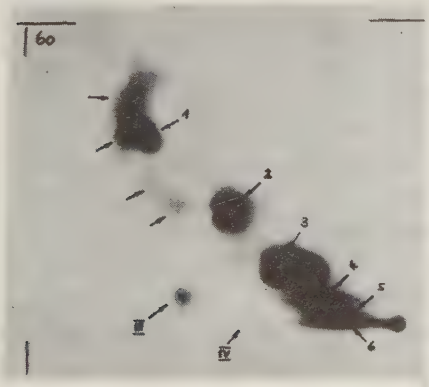

Abb. 24 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie von Poly-Pi "C" und "D" im Alkali-Extrakt nach TCA-Neutralisation; arabische Zahlen: Polyphosphate; römische: Metaphosphate; Ordinate: Laufrichtung des sauren, Abszisse: des alkalischen Lösungsmittels.

neben hochmolekularen ^{32}P-Polyphosphaten mit einer Kettenlänge von mehr als 10 Phosphorsäure-Resten am Startfleck 6 verschiedene ^{32}P-markierte Phosphatverbindungen. Gleichzeitig ist aus Abb. 23 zu entnehmen, daß die Rf-Werte der Oligophosphate je nach aufgetragener Menge schwankten. Zur genauen Identifizierung durch Vergleichssubstanzen, wurde die optimal verdünnte Probe (bezogen auf ihre ^{32}P-Radioaktivität) zweidimensional chromatographiert (Abb. 24). Neben ^{32}P-markierten hochmolekularen Phosphaten am Startfleck, liegen Polyphosphate mit 2 bis 6 Phosphorsäure-Resten, nämlich Orthophosphat, sowie Tri- und Tetrametaphosphat markiert in der Fraktion Poly-Pi "C" und "D" vor. Besonders auffallend ist auch hier das Auftreten von Metaphosphaten, wenngleich auch nur mit verhältnismäßig schwacher ^{32}P-Markierung. Sie konnten von KANAI u. Mitarb. in Chlorella bisher nicht nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist weiterhin die Verteilung des Radiophosphors innerhalb der einzelnen Polyphosphate. Danach scheint der Anteil der ^{32}P-Oligophosphate am Gesamtphosphat dieser Fraktion mindestens genausogroß zu sein wie der der hochmolekularen ^{32}P-Kondensate am Startfleck!

Die zweite Hälfte der "konzentrierten Alkali"-Fraktion, welche mit konzentrierter PCA neutralisiert wurde, ergab nach Abtrennung des entstandenen Präzipitats einen Überstand, der definitionsgemäß (vgl. KANAI u. Mitarb. 1965) Poly-Pi "D" enthält. Hierbei sollte Poly-Pi "C" aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit ebenfalls ausfallen. Proben wurden in der bereits beschriebenen Weise zunächst eindimensional chromatographiert (Abb. 25). Auch hier wanderten, genau wie in Abb. 23, 6 ^{32}P-markierte Verbindungen aus dem Startfleck aus. Abb. 26 zeigt dann das Autoradiogramm einer zweidimensionalen dünnschichtchromatographischen Auftrennung einer Probe der gleichen Fraktion: Schwärzungsflecke für alle Poly-Phosphate mit 2 bis 6 Phosphorsäure-Resten neben Tri- und Tetrametaphosphat sind zu erkennen. Vergleicht man Abb. 24 mit Abb. 26, so wird deutlich, daß quantitativ und qualitativ

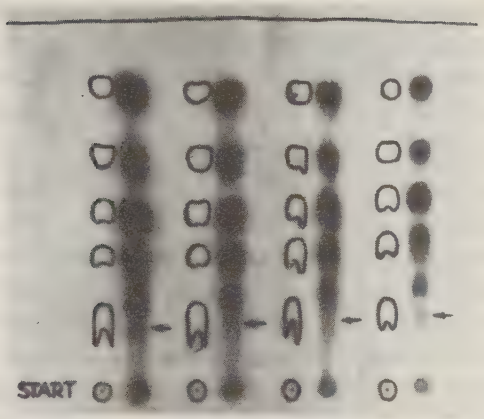

Abb. 25 Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Poly-Pi "D" mit einem sauren Fließmittel. (Vergleichssubstanzen unter Abb. 19 erläutert). Zur besseren Auftrennung der Schwärzungsflecke wurden unterschiedliche Mengen aufgetragen und chromatographiert.

Abb. 26 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie von Poly-Pi "D"; arabische Zahlen: Polyphosphate; römische Zahlen: Metaphosphate; Ordinate: Laufrichtung des sauren, Abszisse: des alkalischen Lösungsmittels.

zwischen dem Gemisch aus Poly-Pi "C" und "D" sowie Poly-Pi "D" kaum Unterschiede bestehen. So war es wenig überraschend, daß die Auftrennung des durch PCA-Zusatz gebildeten Präzipitats bei der Neutralisation des Alkali-Extraktes, das theoretisch aus Poly-Pi "C" bestehen sollte, lediglich ^{32}P-Orthophosphat erbrachte (Abb. 27).

Vom gleichen Zellmaterial wurde parallel zur konventionellen Extraktion an einer Probe als Kontrolle die Extraktion und Reinigung der markierten kondensierten Phosphate nach der oben entwickelten Methode durchgeführt (Säulenchromatographie an MAK und QAE-Sephadex). Das Ergebnis der dünnschichtchromatographischen Auftrennung (Abb. 28) entspricht dem früherer Versuche (vgl. Abb. 15a und b, Seite 30).

KANAI und Mitarb. erzielten mit ihrem Trennungsgang zwar eine quantitative Aufteilung anorganischer Polyphosphate, hinsichtlich der Zusammensetzung derselben ergeben sich jedoch einige Unterschiede im Vergleich zum neuentwickelten Verfahren der Extraktion und Reinigung von kondensierten Phosphaten aus Anacystis nidulans. Abb. 28 zeigt eindeutig, daß bei Anwendung der letzteren weitaus mehr ^{32}P-markiertes hochmolekulares kondensiertes Phosphat am Startfleck verbleibt als bei der Auftrennung der Fraktionen Poly-Pi "A" "B" "C" und "D", die nach KANAI u. Mitarb. isoliert wurden (vgl. Abb. 23 - 25). Da einerseits die Oligophosphate eine stärkere ^{32}P-Markierung bei Gewinnung durch konventionelle Extraktion tragen, diese andererseits aber quantitativ verlaufen soll, kann das vermehrte Auftreten von ^{32}P-Oligophosphaten nur auf einem Zerfall ^{32}P-markierter hochmolekularer kondensierter Phosphate durch hydrolytische Spaltung beruhen. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden die ^{32}P-markierten hochmolekularen Kondensate, die am Startfleck verblieben waren, aus der Celluloseschicht extrahiert und entsprechend der Vorschrift von KANAI u. Mitarb. genau der gleichen Säure- und Alkalibehandlung wie zuvor die intakten Zellen unterworfen. Eine Extraktion für 45 min. mit TCA in

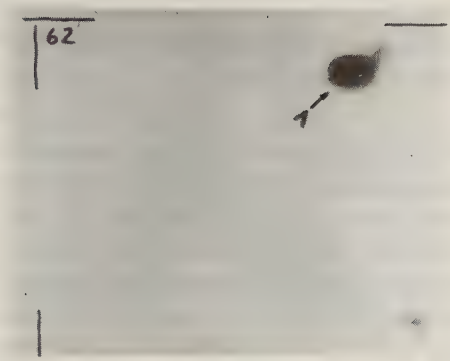

Abb. 27 Zweidimensionale Trennung von Poly-Pi "C"; 1: Orthophosphat; Ordinate: saure, Abszisse: alkalische Laufmittelrichtung.

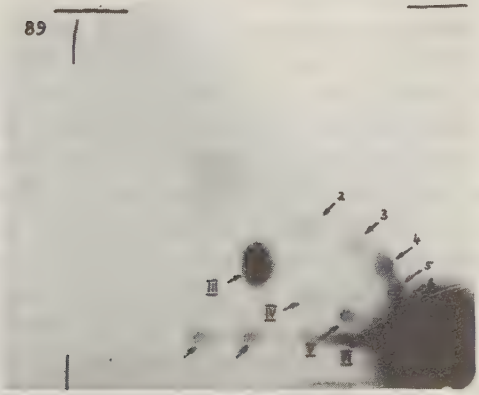

Abb. 28 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate nach Phenolextraktion und Vorreinigung durch Säulenchromatographie an MAK und QAE-Sephadex; arabische Zahlen: Polyphosphate; römische Zahlen: Metaphosphate; Ordinate: saure, Abszisse: alkalische Laufmittelrichtung.

der Kälte (0° C) erbrachte die säurelösliche Fraktion. Ihre Zusammensetzung nach Neutralisation mit KOH wurde durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie analysiert (Abb. 29).

Aus Abb. 29 ist zu entnehmen, daß die Behandlung mit TCA selbst bei 0° C eine teilweise Hydrolyse der hochmolekularen Phosphatverbindungen zur Folge hatte. Die Schwärzung der getrennten Flecken und ihre Größe zeigen an, daß der größte Teil der markierten Spaltprodukte aus Ortho- und Diphosphat besteht. Mit abnehmender ^{32}P-Markierung folgen die Tri-, Tetra- und Pentapolyphosphate, sowie das Trimetaphosphat. Offensichtlich verläuft die abbauende Hydrolyse der hochmolekularen Phosphate aber keineswegs quantitativ, da am Startfleck noch relativ viel ^{32}P-Radioaktivität verblieben ist.

Das Auftreten von Trimetaphosphat als Hydrolyse-Produkt im sauren Medium wurde bereits früher von THILO (1955) nachgewiesen. Das Trimetaphosphat wäre demnach als Zwischenstufe des Abbaues aufzufassen; über Tripolyphosphat würde es schließlich sekundär zu Monophosphat aufgespalten. Nach THILO (1957) wird diese Hydrolyse der makromolekularen Phosphate "vom Ende her" von einer anderen Spaltung überlagert, die statistisch im Inneren der Polyphosphatketten ansetzt und zur Bildung von Gemischen niedermolekularer Kettenbruchstücke führt. Eine andere Probe der dünnschichtchromatographisch gereinigten hochmolekularen kondensierten Phosphate wurde entsprechend alkalisch behandelt (20 h bei 37° C mit 2 N KOH). Nach Neutralisation dieser Alkali-Fraktion mit TCA wurde eine Probe derselben wie üblich zweidimensional auf der Dünnschichtplatte an Cellulose aufgetrennt (Abb. 30). Ebenso wie unter dem Einfluß von Trichloressigsäure erfolgt auch bei der Alkalibehandlung gemäß der Vorschrift von KANAI u. Mitarb. eine Aufspaltung der hochmolekularen kondensierten Phosphate, die ursprünglich aus Homogenaten der Blaualge Anacystis durch Phenolbehandlung extra-

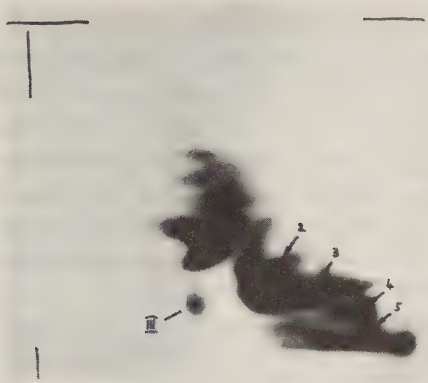

Abb. 29 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie isolierter ^{32}P-markierter hochmolekularer kondensierter Phosphate nach Hydrolyse mit TCA in der Kälte.

Abb. 30 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der hochmolekularen ^{32}P-markierten Phosphate nach alkalischer Hydrolyse mit 2 N KOH.

hiert worden waren. Unter den Spaltprodukten überwiegen markiertes Ortho- und Diphosphat; einen geringeren Anteil bilden die linearen ^{32}P-Oligophosphate, während am Startfleck noch Reste der hochmolekularen ^{32}P-Kondensate zu finden sind. Es fehlen jedoch markierte Metaphosphate in nachweisbaren Mengen. Während durch KOH unter den vorgenannten Bedingungen die hochmolekularen Phosphate nicht vollständig hydrolysiert werden, vermag dies eine Hydrolyse mit 2 N NaOH. Bereits nach 5 h Einwirkung bei 37° C ist im Gemisch keine ^{32}P-Radioaktivität mehr am Startfleck und damit in den hochmolekularen Phosphaten nachweisbar. Die Umwandlung der letzteren in markierte kondensierte Oligophosphate mit maximal 8 Phosphorsäure-Resten ist quantitativ (Abb. 31). Auch das ^{32}P-Trimetaphosphat ist vollständig hydrolysiert, während markierte Tetra-, Penta- und Hexametaphosphate eigenartigerweise weiterhin auftreten und offensichtlich beständig sind. Hieraus ist zu schließen, daß das Trimetaphosphat gegenüber Alkali wesentlich instabiler als die übrigen kondensierten Metaphosphate ist.

Abb. 31 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der isolierten ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate nach Hydrolyse mit 2 N NaOH für 5 h bei 37° C.

Die erhaltenen Befunde zeigen deutlich, daß bei der Anwendung konventioneller Extraktionsmethoden, die sich einer Säure- bzw. Alkaliextraktion bedienen, unbedingt mit einem hydrolytischen Abbau hochmolekularer Kondensate gerechnet werden muß. Dieser kann je nach Wahl der Bedingungen kleiner oder größer sein. Außerdem entziehen sich dabei die Metaphosphate, mit Ausnahme des Trimetaphosphates, fast völlig dem qualitativen Nachweis.

VI. Zur Existenz eines RNS-Polyphosphat-Komplexes

Wie bereits bei der Isolierung der ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate dargelegt wurde (vgl. Seite 20), bereitete die Abtrennung der Nukleinsäuren, insbesondere der löslichen RNS, von den kondensierten Phosphaten die größte methodische Schwierigkeit. Daher lag der Gedanke nahe, darin einen Hinweis für das Vorliegen eines relativ stabilen RNS-Polyphosphat-Komplexes zu sehen.

Zur Abklärung dieses Problems wurden die Zellen der Blaualge einer Alkoholextraktion, basierend auf einer Modifikation der Methode von WANG u. MANCINI (1966) unterworfen. Mit der letzteren gelang den Autoren die Isolierung eines Komplexes aus RNS und Polyphosphaten aus Weizenblättern.

Die durchgeführten Experimente ergaben, daß nur dann eine Isolierung von kondensierten Phosphaten mit wässrigem Alkohol gelang, wenn bei der Kurzzeit-Markierung mit ^{32}P-Orthophosphat etwa die dreifache Zellmenge im Versuchsansatz vorlag. Es resultierte dann ein abweichendes Markierungsmuster für kondensierte Phosphate und Nukleinsäuren; nach Phenolbehandlung, Alkoholfällung und anschließender Säulenchromatographie an MAK fehlt im Eluierungsdiagramm das für kondensierte Phosphate typische Maximum der Radioaktivität zwischen den Absorptionsmaxima für lösliche RNS und DNS (Abb. 32, linker Teil).

Für diese Zellen erbringt die Phenolextraktion demnach nur relativ geringe Mengen an ^{32}P-markierten kondensierten

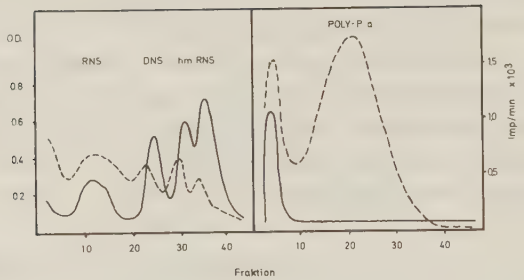

Abb. 32 Linker Teil: MAK-Chromatographie der isolierten kondensierten Phosphate und Nukleinsäuren nach ^{32}P-Markierung von Zellen in dichter Suspension (Kontrollversuch). Rechter Teil: MAK-Säulenchromatographie der Alkoholfraktion II. Es wurde hierfür das gleiche Material wie im dargestellten Kontrollversuch verwendet. - - - : ^{32}P-Radioaktivität in Imp/min.; ----- : Absorption bei 254 nm.

Abb. 33 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der mit Alkohol extrahierten und über MAK vorgereinigten ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate; arabische Zahlen: Polyphosphate; (III): Trimetaphosphat; Ordinate: Laufrichtung des sauren, Abszisse: des alkalischen Laufmittelgemisches.

Phosphaten. Trotzdem enthielten die ersteren solche Verbindungen, deren Extraktion allerdings nur durch eine Behandlung der intakten Zellen mit wässrigem Alkohol (s.o.) gelang. Wurde dann das extrahierte Material auf einer MAK-Säule getrennt, so resultierte im Profil der Radioaktivität das für kondensierte Phosphate typische Maximum zwischen löslicher RNS und DNS, welches kein koinzidierendes Bild in der UV-Absorption (254 nm) besaß (Abb. 32, rechte Hälfte). Wurden umgekehrt Zellen, die bei normaler Dichte mit ^{32}P-Orthophosphat inkubiert worden waren, in der gleichen Weise mit Alkohol extrahiert, so war die Ausbeute an markierten kondensierten Phosphaten minimal. Sie erschienen hingegen im Kontrollversuch, wenn nach Phenolbehandlung des Homogenats und Alkoholfällung der wässrigen Phase die Produkte in der üblichen Weise an MAK aufgetrennt wurden. Eine Nachextraktion alkoholbehandelter Zellen mit Phenol bzw. eine Behandlung des Phenolextraktes nach Entfernung der wässrigen Phase (enthaltend die markierten kondensierten Phosphate und die Nukleinsäuren) erbrachte in keinem Falle eine weitere Fraktion markierter kondensierter Phosphate. Hieraus muß geschlossen werden, daß die Extraktion nach den beiden unterschiedlichen Verfahren weitgehend quantitativ verlief. Aus Abb. 32 geht außerdem hervor, daß die Alkoholbehandlung ausschließlich Phosphatverbindungen aus den Zellen entfernte; es fehlt vor allem niedermolekulare RNS vom Typ der löslichen RNS wie das fehlende typische Absorptionsmaximum dieser Komponente anzeigt.

Die Identität der mit Alkohol extrahierbaren ^{32}P-markierten Phosphate wurde ebenfalls durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie ermittelt. Sie waren zuvor durch Säulenchromatographie an MAK und eine 12stündige Dialyse gegen bidest. H_2O gereinigt worden. Abb. 33 zeigt, daß auch hier der überwiegende Teil der Substanzen als hochmolekulare ^{32}P-Kondensate vorliegt. Daneben sind mit geringer radioaktiver Markierung Polyphosphate mit 2 bis 5 Phosphorsäure-

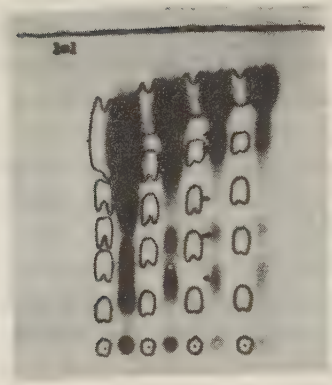

Abb. 34 Dünnschichtchromatographische Trennung der Vorlauf-Fraktion bei der MAK-Trennung; verschiedene Mengen wurden nach Angabe von Vergleichssubstanzen aufgetragen. Folgende Schwärzungsflecke erscheinen (in Laufrichtung): hochmolekulares Phosphat, Tetra- und Trimetaphosphat, Tri- und Diphosphat sowie Orthophosphat.

Abb. 35 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie des Vorlaufes der MAK-Säulenchromatographie; arabische Zahlen: Polyphpsphate; u: nicht identifizierte Substanzen; Ordinate: Laufrichtung des sauren, Abszisse: des alkalischen Laufmittelgemisches.

Resten vorhanden. Überraschenderweise gelang auch hier der Nachweis von ^{32}P-Trimetaphosphat. Möglicherweise liegen daneben cyclische Metaphosphate höherer Ordnung vor, die sich aber auf Grund ihrer geringen Markierung dem eindeutigen Nachweis entzogen.

Die geringe Menge an ^{32}P-Oligophosphaten gab auch hier Veranlassung, die Zusammensetzung der Vorlauffraktion bei der vorangegangenen Säulenchromatographie an MAK näher zu analysieren (Abb. 34). Außer den markierten hochmolekularen Produkten am Startfleck, erscheinen 6 Substanzen mit ^{32}P-Markierung im eindimensionalen Dünnschichtchromatogramm. Die stärkste Markierung von diesen besitzt erwartungsgemäß das Orthophosphat. Zur genaueren Identifizierung wurde eine andere Probe des gleichen Materials zweidimensional chromatographiert (Abb. 35). Das Ergebnis dieser Trennung beweist, daß auch hier bereits mit dem Vorlauf ^{32}P-markierte kondensierte Phosphate die MAK-Säule verlassen. Neben den linearen Polyphosphaten mit 3 bis 5 Phosphorsäure-Resten, tragen vor allem Diphosphat und Orthophosphat die weitaus stärkste Markierung. Am Startfleck bleiben auch hier geringe Anteile von hochmolekularen Kondensaten liegen. Metaphosphate sind nicht nachweisbar.

Diskussion

1. Reinigung der kondensierten Phosphate

Aus den dargestellten Untersuchungen geht eindeutig hervor, daß die neuentwickelte Methode zur Isolierung ^{32}P-markierter kondensierter Phosphate gegenüber den bisher benutzten Verfahren den großen Vorzug besitzt, eine möglichst schonende Extraktion dieser Verbindungen in nativer Form zu ermöglichen. Entscheidend dabei ist, daß der pH-Wert stets zwischen 7,0 und 8,0 liegt und daß die Temperatur während der gesamten Prozedur nie über Zimmertemperatur ansteigt. Unter diesen Bedingungen sind die Polyphosphate in Lösung praktisch beliebig lange beständig. Erst mit steigender Erwärmung (ab 60° C) und erhöhter Wasserstoffionenkonzentration werden sie in zunehmendem Maße hydrolytisch gespalten und gehen schließlich in zweifach saures Monophosphat über (CAMPBELL 1954; GROWTHER 1954a, b, c und 1956; HEALY 1955; THILO 1967). Auch die Metaphosphate sind bei Zimmertemperatur und bei einem pH-Wert in der Nähe des Neutralpunktes in wässriger Lösung praktisch unbegrenzt beständig. Hydrolytische Spaltung erfolgt bei Temperaturanstieg (ab 60° C) und bei Erniedrigung des pH-Wertes (BROWKINA 1952).

Die Ergebnisse der säulenchromatographischen Auftrennung der isolierten kondensierten Phosphate sprechen ebenfalls dafür, daß die Verbindungen in ihrer nativen Form vorliegen; wird doch ihre Masse in Form hochmolekularer ^{32}P-Kondensate wiedergefunden und nur ein Bruchteil als niedermolekulare Oligophosphate (vgl. Abb. 30, Seite 45). Hierfür spricht auch, daß die höhermolekularen ^{32}P-Polyphosphate ein Gemisch aus Produkten unterschiedlicher Kettenlänge darstellen (vgl. Abb. 12, Seite 26). Dies ist auch bei synthetisch hergestellten Polyphosphaten die Regel (THILO 1955). Hingegen wurde bei Anwendung konventioneller Extrakrionsmethoden (Säure- bzw. Alkali-Extraktion) vorwiegend niedermolekulare ^{32}P-Kondensate isoliert (vgl. Abb. 20, Seite 36; Abb. 22, Seite 38; Abb. 24, Seite 39).

Theoretisch könnte es bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung zu einer partiellen hydrolytischen Spaltung kondensierter Phosphate kommen, da die Platte zuerst mit einem sauren Lösungsmittel entwickelt wird. Der große Vorteil der Dünnschichtchromatographie besteht aber gerade darin, daß die Laufzeiten im Gegensatz zur früher benutzten Papierchromatographie wesentlich kürzer sind. Während man bei der letzteren bis zu 16 h entwickeln und daher mit einer partiellen Spaltung kondensierter Phosphate rechnen muß (vgl. HETTLER 1958; RÖSSEL 1963a; RÖSSEL u. KIESSLICH 1967), kommt man bei der Dünnschichtchromatographie der kondensierten Phosphate mit Laufzeiten von 60 bis 75 min. aus (AURENGE u. NORMAND 1963; RÖSSEL 1963b; RÖSSEL u. KIESSLICH 1967). Bei diesem zeitlich stark verkürztem Verfahren konnten RÖSSEL u. KIESSLICH 1967 bei Verwendung eines Methanol-Dioxan-Fließmittels (MD 4) keine hydrolytische Spaltung kondensierter Phosphate mehr feststellen.

Hingegen sind hydrolxtische Effekte bei der Verwendung von Säuren und Basen zur Extraktion der kondensierten Phosphate offensichtlich unvermeidlich. Die als Poly-Pi "A" bezeichnete Fraktion, die durch kalte TCA extrahiert wird, muß nach den vorliegenden Ergebnissen als ein Folgeprodukt der hydrolytischen Spaltung höherer Kondensate aufgefaßt werden. Hier herrschte bisher die Meinung vor, daß bei tiefen Temperaturen eine Spaltung von labilen Phosphatverbindungen durch TCA weitgehend unterbleibt (WIAME 1949; KANDLER 1950; ALBAUM u. Mitarb. 1950; SCHWINCK 1956). Allerdings ist bereits von einigen Autoren immer wieder darauf hingewiesen worden, daß präzise Angaben über die genaue Menge des, während der Extraktion entstehenden labilen Phosphates nicht möglich sind. In Bezug auf die ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate sind hier vergleichende Aussagen möglich geworden (vgl. Abb. 20, Seite 36 und Abb. 29, Seite 45). Sie verdeutlichen, daß es sich bei der "säurelöslichen Fraktion" mit

ziemlicher Sicherheit um abgebaute höhermolekulare Kondensate handelt.

Auch das Auftreten von Trimetaphosphat in der gleichen Fraktion (Abb. 20, Seite 36) unterstützt diese Auffassung denn auch BELL (1947) sowie THILO, SCHULZ u. WICHMANN (1953) erhielten nach saurer Hydrolyse von Polyphosphaten neben Orthophosphat und verschiedenen niedermolekularen Polyphosphaten auch Trimetaphosphat als Endprodukt (vgl. auch Abb. 29, Seite 45).

Die Fraktion Poly-Pi "B" (pH-9-Fraktion) wird zwar unter relativ schonenden Bedingungen extrahiert, enthält jedoch den geringsten Anteil der gesamten kondensierten Phosphate, welche bei der konventionellen Extraktion anfallen. Die Abwesenheit von Metaphosphaten in dieser Fraktion, wie sie von KANAI u. Mitarb. für Chlorella berichtet worden ist, könnte unter anderem darauf beruhen, daß diese Verbindungen nicht durch die angewendete Bariumnitrat-Fällung erfaßt wurden. Letztere ist nämlich zum Nachweis von Tripoly- und Metaphosphaten nicht geeignet (KORNBERG 1956).

In der "konzentrierte Alkali"-Fraktion (Poly-Pi "C" und "D", s. Abb. 24, Seite 39) kommt es ebenfalls zur hydrolytischen Spaltung von kondensierten Phosphaten (vgl. Abb. 30, Seite 45 und Abb. 31, Seite 46). In alkalischer Lösung (pH 9) werden auch die Metaphosphate gespalten und gehen zunächst in die entsprechenden linearen Polyphosphate über (THILO 1959). Daher ist es nicht verwunderlich, daß das Trimetaphosphat, welches mit der Phenolmethode mit verhältnismäßig starker ^{32}P-Markierung isoliert werden konnte, in alkalischer Lösung nur noch relativ schwach markiert ist (vgl. Abb. 24, Seite 39 und Abb. 28, Seite 43). Unter Einwirkung von NaOH (vgl. Abb. 31, Seite 46) wird es sogar völlig abgebaut.

Somit ist lediglich die Fraktion Poly-Pi "B", extrahiert mit verdünntem Alkali bei pH 9, als eine Fraktion mit weitgehend nativen Phosphorverbindungen anzusehen. Aus diesem Grunde sind auch Aussagen über mögliche physiologische

Funktionen der übrigen Fraktionen (z.B. KANAI u. SIMONIS 1968) nur mit Einschränkungen möglich.

2. Die markierten kondensierten Phosphate aus Anacystis

In lebenden Organismen wurde von den Metaphosphaten, den cyclischen kondensierten Phosphaten, bislang nur das Trimetaphosphat bei Hefe (RAFTER 1959) und in Zellen von Euglena (LOHMANN 1958) mit Sicherheit nachgewiesen. Das Auffinden dieser Verbindung zusammen mit weiteren Metaphosphaten in markiertem Zustand (vgl. Abb. 15a und 16a, Seite 30 und 32) bei Anacystis ist daher umso bedeutungsvoller, weil einige frühere Nachweise des Trimetaphosphats noch der Bestätigung bedürfen. So fanden KORNBERG (1955) sowie LIEBERMANN u. SWENSON (1963) sowie einige andere Autoren ebenfalls Trimetaphosphat in Hefen, wenn sie die Zellen zunächst mit Trichloressigsäure extrahierten. Unter diesen Bedingungen besteht jedoch die Möglichkeit, daß die Verbindung bei der eintretenden hydrolytischen Spaltung der höhermolekularen kondensierten Phosphate als Zwischenprodukt entsteht (vgl. Abb. 29, Seite 45). Diese Vermutung ist auch von MEISSNER (1958) geäußert worden.

Hingegen wurden die höheren cyclischen Phosphate wie Tetra-, Penta-, Hexa- und Heptametaphosphat bisher in lebenden Organismen noch nicht nachgewiesen. In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, daß vor einigen Jahren allerdings schon spezifische Enzyme, nämlich Metaphosphatasen, identifiziert wurden (INGELMANN 1950; SCHMIDT 1951; MEISSNER 1957; MATTENHEIMER 1958). In der Bäckerhefe fand MATTENHEIMER (1953) mindestens 2 aktive Metaphosphatasen - vorwiegend Tri- und Tetrametaphosphatasen - , welche cyclische Metaphosphate spezifisch spalteten. Erstaunlich ist, daß außer diesen Metaphosphatasen auch Polyphosphatasen nicht nur in Mikroorganismen gefunden wurden, sondern auch in solchen Organismen, für die bisher das Auftreten von Poly- und Metaphosphaten unbekannt ist. ROTHENBACH u. HINKELMANN (1954) wiesen diese

Enzyme in Gerste, PIERPOINT (1957a, b) in Extrakten aus Erbsen, AGRAWAL u. KRISHNAN (1959) in Blättern von Manihot utilissima nach. Außerdem gelang es MATTENHEIMER (1951, 1958) mit Extrakten aus Säugetierorganen Poly- und Metaphosphate abzubauen. Weiterhin wurden solche Enzyme in der Darmschleimhaut (BERG u. GORDON 1960) und im menschlichen sowie im Rinder-Serum (EBEL u. MEHR 1957) identifiziert. Nachdem MATTENHEIMER (1956a, b, c und 1958) in seinen Untersuchungen gezeigt hatte, daß die Poly- und Metaphosphatasen substratspezifisch eingestellt sind (in Manihot scheinen sich allerdings auch andere Phosphatverbindungen spalten zu können), kann daraus geschlossen werden, daß als Substrate auch Poly- und Metaphosphate in den Zellen vorliegen müssen.

Nach MATTENHEIMER (1958) würden auch in tierischen Organismen aus ATP laufend Polyphosphate gebildet, wenn nicht spezifische Enzyme vorhanden wären, die sie sofort wieder abbauen; letztere üben somit eine Art Schutzfunktion aus, indem sie gewissermaßen unphysiologische Anhäufungen von Polyphosphaten verhindern. Diese könnten nämlich als Ionenaustauscher wirken (VAN WAZER u. CAMPANELLA 1950) und durch Bindung von essentiellen Kationen unter Umständen Enzymreaktionen und dadurch den Gesamtstoffwechsel empfindlich stören. Diese Vorstellung ist aber sicherlich nur bedingt richtig, da in jüngster Zeit gezeigt werden konnte, daß Polyphosphate auch in tierischen Geweben, vor allem in den Zellkernen, nativ vorliegen (GROSSMANN u. LANG 1962; PENNIALL u. Mitarb. 1962, 1964; GRIFFIN u. Mitarb. 1965, 1966; LYNN u. BROWN 1963; SHIOKAWA u. YAMANA 1965). Eine Gültigkeit der an Mikroorganismen erhaltenen Befunde für höhere Organismen ist in diesem Falle nicht unbedingt gegeben. Möglicherweise zeigt die hier beschriebene Isolierungsmethode einen neuen Weg auf, der zum Nachweis von Metaphosphaten in anderen Organismen beschritten werden könnte.

Auch das Auftreten der einzelnen Oligophosphate mit 2 bis 7 Phosphorsäure-Resten in Anacystis in vivo ist recht auf-

schlußreich. Bei Anwendung der bisher üblichen Extraktionsmethoden war nicht eindeutig zu entscheiden, ob diese Verbindungen Hydrolyse-Produkte hochkondensierter Polyphosphate oder tatsächlich stoffwechselaktive, native Zwischenprodukte darstellen. Erst die Phenolextraktion und nachfolgende Reinigung durch ein Hydrolyse vermeidendes Verfahren erbrachte den eindeutigen Nachweis, daß diese niedermolekularen anorganischen Kondensate nativer Herkunft sind.

Auch auf Grund der elektrochemischen Eigenschaften ist die Existenz nativer kondensierter Oligophosphate in den Zellen denkbar. Bei den Polyphosphaten liegt bekanntlich eine beachtliche Anhäufung von negativen Ladungen vor. Nach LIPMANN (1951) bewirkt sie eine Abschirmung der Moleküle von Wassermolekeln. Dadurch entfällt unter normalen Bedingungen auch der Zutritt von solchen Wassermolekeln, die zur hydrolytischen Spaltung der P- O- P-Bindungen notwendig sind; der Abbau der Polyphosphate wird auf diese Weise erschwert. Hieraus erklärt sich, warum das ungeladene Essigsäureanhydrid in relativ kurzer Zeit, das wenig geladene Acetylphosphat in einigen Stunden und das 4fach geladene Pyrophosphat in reinem Wasser überhaupt nicht gespalten wird, obwohl die bei der Spaltung freiwerdenden Energien in allen 3 Fällen in der gleichen Größenordnung liegen (NETTER 1959). Unter der Voraussetzung, daß die Polyphosphate als Energiedonatoren oder Phosphatlieferanten aktiv am Stoffwechsel teilnehmen (vgl. KUHL 1960; HAROLD 1966; TAMIYA 1966), könnten die negativen Ladungen die biologisch wichtige kinetische Stabilität der einzelnen Oligophosphate, wie sie vom ATP her bekannt ist, gewährleisten. Hieraus würde sich dann auch das natürliche Vorkommen der einzelnen niedermolekularen Polyphosphate erklären, die bei Bedarf durch spezifische Enzyme in den Stoffwechsel eingeschleust werden.

Welche Rolle die gefundenen cyclischen Metaphosphate und linearen Polyphosphate im Stoffwechsel von Anacystis spielen, muß in weiteren Versuchen geklärt werden. Es wäre möglich,

daß die Synthese der hochmolekularen kondensierten Phosphate über die cyclischen Phosphate erfolgt, während der Abbau von hochmolekularen Kondensaten, katalysiert durch spezifische Depolymerasen, über die Oligophosphate bis zum Diphosphat, bzw. Orthophosphat abläuft. Es ist sehr wahrscheinlich, daß das Diphosphat dabei eine Schlüsselstellung einnimmt, indem es auf Grund seiner hohen Konzentration im Vergleich zu den übrigen Oligophosphaten eine regulierende Funktion ausübt. Die Bedeutung des Diphosphates im Stoffwechsel wird dadurch unterstrichen, daß es bei den verschiedenartigen Reaktionen wie Synthesen und Spaltungen als Nebenprodukt entsteht.

Natürlich kann auf Grund der bisher vorliegenden Ergebnisse bei Anacystis nicht ausgeschlossen werden, daß die Synthese hochmolekularer Phosphate auch umgekehrt über die linearen niederen Kondensate oder auch auf einem völlig anderen Weg erfolgt. Verschiedentlich ist auch eine Bildung von kondensierten Phosphaten durch ATP diskutiert worden, welche direkt zu hochmolekularen Kondensaten führen soll (WIAME 1948;BELOZERSKY 1958; LOHMANN 1958; BUCHOWICZ u. BELOZERSKY 1958, 1959; DREWS 1960). THILO, GRUNZE, HÄMMERLING u. WERZ fanden in der Grünalge Acetabularia neben Monophosphat nur Polyphosphate in hochmolekularer Form, d.h. sie konnten keine Oligophosphate nachweisen. Daraus schlossen sie, daß der Auf- und Abbau der Polyphosphatgranula im Cytoplasma in Form von Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen von den Kettenenden des Polyphosphatanions verläuft (vgl. auch LANGEN u. LISS 1958 a und b).

Auf jeden Fall läßt die relativ viel stärkere Markierung des Trimetaphosphates im Kurzzeit-Markierungsexperiment (vgl. Abb. 14, Seite 28; Abb. 15a, Seite 30; Abb. 29, Seite 45) gegenüber den anderen Poly- und Metaphosphaten erwarten, daß diese Verbindung eine besondere Funktion im Stoffwechsel der Phosphatverbindungen ausübt.

Andererseits ist es sehr wahrscheinlich, daß der Abbau

von hochmolekularen kondensierten Phosphaten stufenweise, vielleicht unter Mitwirkung mehrerer Depolymerasen (Polyphosphatasen) erfolgt. Nach den Ergebnissen, welche mit der Dünnschichtchromatographie der ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate aus Anacystis an PEI-Cellulose erhalten wurden (vgl. Seite 25) sind vermutlich 4 Zwischenstufen zu erwarten. Diese Vorstellung entspricht weitgehend den Vorstellungen von LANGEN u. LISS (1958, 1962), die ebenfalls 4 Kondensations-Stufen beim biologischen Abbau vermuten, nämlich mit 260 Phosphorsäure-Resten (Poly P 4), 55 (Poly P 3, 20 (Poly P 2) bzw. 4 (Poly P 1). Allerdings dürfte zumindestens bei Anacystis für Poly P 1 eine etwa gleiche Verteilung der Verbindungen mit 3 bis 8 Phosphorsäure-Resten anzusetzen sein (vgl. Abb. 15a, Seite 30). Die Rechromatographie der vorgereinigten ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate an QAE-Sephadex hingegen läßt für Anacystis nicht 4 sondern wenigstens 8 Kondensationsgruppen erwarten (vgl. Abb. 12, Seite 26). Solange jedoch eine weitere Auftrennung der hochmolekularen kondensierten Phosphate methodisch nicht möglich ist, ist dieses Problem nicht eindeutig abzuklären.

Überraschend war das Ergebnis der Alkoholextraktion intakter Zellen nach Kurzzeit-Markierung mit ^{32}P-Orthophosphat, welche im Vergleich zum neuentwickelten Extraktions- und Reinigungsverfahren für kondensierte Phosphate durchgeführt wurde. Die mit Alkohol extrahierbaren kondensierten Phosphate, die nur bei Markierung der Zellen in relativ dichter Suspension ^{32}P einbauen, verkörpern sicherlich eine andere Fraktion als die, welche beim Kurzzeit-Markierungsexperiment mit normaler Zelldichte synthetisiert werden und nur mit Phenol extrahierbar sind. Dieser Einbau von ^{32}P-Orthophosphat in Fraktionen mit unterschiedlicher Extrahierbarkeit, der zudem von den äußeren Bedingungen abhängig ist, könnte als Ausdruck einer verschiedenen Lokalisation der kondensierten Phosphate in der Zelle aufgefaßt werden. Während die durch Phenolbehandlung isolierbaren Verbindungen wahrscheinlich Bestandteile der Volutingranula bzw. ähnlicher Aggre-

gationen sind (vgl. WIDRA 1959, KUHL 1960, HAROLD 1966), würden sich in der Alkoholfraktion solche kondensierten Phosphate sammeln, welche an die Zellwand oder an Membranen des Cytoplasmas gebunden sind (vgl. HAROLD 1961, 1966; SOUZU 1966).

3. RNS-Polyphosphat-Komplex

Die Diskussion über die Existenz eines stabilen Komplexes aus RNS und kondensierten Phosphaten ("RNS-Poly-P-Komplex") in vivo begann vor vielen Jahren und hält bis heute an. Die ältere Literatur befaßt sich in erster Linie mit den stoffwechselphysiologischen Grundlagen einer solchen Komplexbildung. So soll beispielsweise die aktive Rolle der Polyphosphate im Stoffwechsel durch Anlagerung an RNS erhöht werden (KRISHNAN, DAMLE u. BAJAJ 1957; KULAEV u. BELOZERSKY 1957; BELOZERSKY u. KULAEV 1957). WIAME (1949) fand, daß in phosphatreichen Hefezellen nach dem Überführen in ein phosphatfreies Nährmedium die Synthese der Nukleinsäuren von einem Abbau der Polyphosphate begleitet wird (vgl. auch BELOZERSKY 1955, 1958). Ähnliche Beobachtungen machten auch MUDD, YOSHIDA u. KOIKE (1958) bei Mycobakterien.

Neuere Untersuchungen befassen sich vor allem mit der Natur solcher Komplexe aus RNS und kondensierten Phosphaten. Obwohl einerseits ein Vorkommen natürlicher Komplexe durchaus möglich ist (vgl. dazu KULAEV u. BELOZERSKY 1958; EBEL u. Mitarb. 1958, 1962; CORELL u. TOLBERT 1962, 1964 sowie CORELL 1965), muß andererseits doch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die Komplexbildung erst sekundär bei der Extraktion als Artefakt erfolgt. Für das natürliche Vorkommen wird das Verhalten bei der Elektrophorese als Kriterium gewertet. KULAEV u. BELOZERSKY (1958) zeigten, daß der aus Aspergillus niger isolierte RNS-Poly-P-Komplex elektrophoretisch nicht in seine Bestandteile zu zerlegen ist und somit als homogene Bande wandert. Das gleiche Verhalten beobachten DIRHEIMER u. Mitarb. (1963) sowie EBEL u. Mitarb. (1963) und STAHL u. Mitarb. (1963) an RNS-Poly-P-Komplexen aus Hefe. Letztere verhalten sich auch bei einer

Fällung mit Basen einheitlich; allerdings dissoziieren die Komplexe vollständig bei einer Behandlung mit Kohle (DIRHEIMER u. Mitarb. 1963; EBEL u. Mitarb. 1962b; MULLER-FELTER u. EBEL 1962). Die Ionenbindungen zwischen den Phosphatgruppen und den Nukleinsäure-Basen, welche für die Komplexbildung verantwortlich zu sein scheinen, werden möglicherweise über Mg^{2+}-Brücken geschlossen. Die Stabilität dieser Komplexe hängt auch von der Kettenlänge der Nukleinsäuren und der beteiligten Polyphosphate ab (STAHL u. Mitarb. 1963). Die meisten Autoren neigen zu der Auffassung, daß die Komplexe erst während der Extraktion entstehen und nicht in vivo existieren.

WANG u. MANCINI (1966) konnten einen mit wässrigem Alkohol extrahierten RNS-Poly-P-Komplex mit Hilfe der Gelfiltration - allerdings nur unvollständig - zerlegen. Für die mit Alkohol aus Anacystis nidulans extrahierbaren markierten kondensierten Phosphate war bei Auftrennung an der MAK-Säule (vgl. Abb. 32, Seite 48) lediglich ein Maximum im Profil der Radioaktivität vorhanden, hingegen keines in dem der UV-Absorption. Hieraus folgt, daß bei Anacystis unter den gewählten Versuchsbedingungen kein RNS-Poly-P-Komplex nativ vorliegt. Dieser Befund ist in sofern eindeutig, als intakte Zellen ohne Homogenisation extrahiert wurden, wodurch eine Artefaktbildung während der Extraktionsprozedur vermieden wurde. WANG u. MANCINI (1966) hatten die Weizenblätter vor der Extraktion der kondensierten Phosphate zerkleinert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an Anacystis unterstützen die Ansicht von WANG u. MANCINI, daß erst unter den Bedingungen der Extraktion Aggregationen zwischen RNS und kondensierten Phosphaten zustande kommen. Die Existenz natürlicher RNS-Poly-P-Komplexe wird damit noch mehr in Frage gestellt.

Zusammenfassung

1. Die experimentellen Voraussetzungen für eine gezielte ^{32}P-Markierung kondensierter anorganischer Phosphate in Abhängigkeit von Phosphatverarmung, Zelldichte, Markierungsdauer und Menge an ^{32}P-Orthophosphat wurden für Anacystis nidulans untersucht. Folgende Optimalbedingungen wurden ermittelt: Verarmung der Zellsuspension für 20 h im Licht, Markierung für 1 min. mit 10 uC/ml ^{32}P-Orthophosphat im Licht.

2. Die Identifizierung der schnellmarkierten kondensierten Phosphate, die durch MAK-Säulenchromatographie isoliert wurden, gelang folgendermaßen: Anfärbung mit Toluidinblau, RNase- und DNase-Behandlung, saure Hydrolyse (1 N HCl für 7 min. bei 100° C) und Fällung mit Bariumionen.

3. Eine neue Methode zur Extraktion und Reinigung kondensierter Phosphate wurde ausgearbeitet, welche eine hydrolytische Spaltung der letzteren weitgehend vermeidet (Präparation bei Zimmertemperatur und bei pH 7). Sie besteht aus einer gemeinsamen Extraktion der kondensierten Phosphate mit den Nukleinsäuren nach Phenolbehandlung des Zellhomogenats, Auftrennung der Verbindungen an einer Säule aus methyliertem Serumalbumin und Kieselgur (MAK), sowie aus einer anschließenden Säulenchromatographie der kondensierten Phosphate an dem vollquarternären Anionenaustauscher QAE-Sephadex A 50 zur Entfernung der restlichen Nukleinsäuren. Die gewonnenen kondensierten Phosphate liegen dementsprechend mit ziemlicher Sicherheit in nativer Form vor.

4. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der vorgereinigten kondensierten Phosphate an Cellulose, die mit einem sauren bzw. alkalischen Lösungsmittel durchgeführt wurde, ergab, daß der größte Teil der ^{32}P-markierten kondensierten Phosphate aus Verbindungen mit mehr als 8 Phosphorsäure-Resten bestand. Rechromatographie dieser Fraktion an

QAE-Sephadex A 50 lieferte Anzeichen dafür, daß sie aus mindestens 8 Unterfraktionen besteht. Daneben wurden markierte lineare Oligophosphate mit 2 bis 7 Phosphorsäure-Resten und ringförmige Metaphosphate - Tri-, Tetra-, Penta-, Hexa- und Heptametaphosphat - gefunden. Damit gelang erstmalig der Nachweis höherer cyclischer Metaphosphate mit 4 bis 7 Phosphorsäure-Resten in einem pflanzlichen Organismus.

5. Eine weitere Methode zur Auftrennung von gemeinsam extrahierten kondensierten Phosphaten und Nukleinsäuren wurde durch eine Modifizierung der Säulenchromatographie an MAK entwickelt. Die auf diese Weise erhaltenen kondensierten Phosphate entsprachen qualitativ denen, welche auf dem oben geschilderten Weg isoliert wurden. Allerdings tritt bei der modifizierten MAK-Trennung ein relativ starker Verlust an markierten hochmolekularen Kondensaten ein; dafür fehlen aber Verunreinigungen anderer ^{32}-markierter Phosphatverbindungen.

6. Der methodische Vorteil der neuentwickelten Methode wird bei einem Vergleich mit konventionellen Extraktionsmethoden deutlich: im Gegensatz zur Phenolextraktion geht bei Anwendung solcher Methoden ein mehr oder weniger starker hydrolytischer Abbau markierter kondensierter Phosphate mit der Extraktion einher.

7. Behandlung ^{32}P-markierter Zellen von Anacystis mit wässrigem Alkohol führte nicht zu der erwarteten Extraktion eines stabilen Komplexes aus RNS und kondensierten Phosphaten. Die hierbei anfallenden kondensierten Phosphatverbindungen unterscheiden sich in ihrem ^{32}P-Einbau und in der Zusammensetzung deutlich von denen, die unter Standardbedingungen in Anacystis markiert auftreten. Eine unterschiedliche Lokalisation in der Zelle wird für diese Fraktion der schnellmarkierten kondensierten Phosphate diskutiert.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. G. Richter, danke ich für die Überlassung des Themas und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Stiftung Volkswagenwerk sei für apparative Unterstützung gedankt, ebenso Herrn Kiesslich, Chem. Fabrik Dr. Oetker (Budenheim), für die Überlassung der Vergleichssubstanzen.

Literaturverzeichnis

Agrawal, M. and P.S. Krishnan: Enzymologia 21, 18 (1959)
Albaum, H.G., A. Schatz, S.H. Hutner and A.I. Hirshfeld: Arch. Biochem. 29, 210 (1950)
Aoki, S. and S. Miyachi: Plant Cell Physiol. 5, 241 (1964)
Aurenge, J., M. Degeorges et J. Normand: Bull. soc. chim-France 508 (1964)
Bachofen, R., H. Lutz and I. Specht-Jürgensen: Febs Letters 1, 249 (1968)
Bachofen, R. u. I. Specht-Jürgensen: Z. Naturforsch. 22b, 1051 (1967)
Baltscheffsky, M.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 270 (1967)
Beiderbeck, R. and G. Richter: Arch. Mikrobiol. 67, 256 (1969)
Bell, R.N.: Ind. Engng. Chem. 39, 136 (1947)
Belozersky, A.N.: 3. Congrès intern. de biochim. 1955 Bruxelles, Résumés des communications 78 (Nr. 8-50)
Belozersky, A.N.: Report on the 4. intern. Kongreß f. Biochemie, Wien (1958). Sonderdruck der Academy of Sci. USSR.
Belozersky and I.S. Kulaev: Biochimija 22, 29 (1957)
Berg, G. and L.H. Gordon: J. Histochem. Cytochem. 8, 85 (1960)
Browkina, J.A.: J. Allg. Chem. UDSSR 22, 1917 (1952)
Buchowicz, E. and A.N. Belozersky: Biochimija 23, 254 (1958) (Russisch)
Buchowicz, E. and A.N. Belozersky: Dokl. Akad. Nauk. SSSR 124, 1147 (1959) (Russisch)
Campbell, D.O.: J. Amer. Chem. Soc. 76, 893 (1954)
Corell, D.L. and N.E. Tolbert: Plant Physiol. 37, 627 (1962)
Corell, D.L. and N.E. Tolbert: Plant Cell Physiol. 5, 171 (1964)
Corell, D.L.: Plant Cell Physiol. 6, 661 (1965)
Damle, S.P. and P.S. Krishnan: Arch Biochem. Biophys. 49, 58 (1954)
Dirheimer, G., S. Muller-Felter, J.H. Weil, M. Yacoub and J.P. Ebel: Bull. soc. chim. biol. 45, 875 (1963)

Drews, G.: Arch. Mokrobiol. 36, 387 (1960)
Ebel, J.P.: Bull. soc. chim. biol. 34, 321 (1952a)
Ebel, J.P.: Bull. soc. chim. biol. 34, 330 (1952b)
Ebel, J.P.: Bull. soc. chim. biol. 34, 491 (1952c)
Ebel, J.P.: Bull. xoc. chim. biol. 34, 498 (1952d)
Ebel, J.P.: Compt. rend. acad. sci. (paris) 234, 621 (1952e)
Ebel, J.P., G. Dirheimer, M. Yacoub and S. Muller-Felter: Bull. soc. chim. biol. 44, 1167 (1962a)
Ebel, J.P., A. Stahl, G. Dirheimer, S. Muller-Felter and M. Yacoub: Colloq. Intern. Centre Natl. Rech Sci. (Paris) 106, 545 (1962b)
Ebel, J.P., G. Dirheimer, A.J.C. Stahl and M. Yacoub: Bull. soc. chim. biol. 45, 865 (1963)
Grossmann, D. and K. Lang: Biochem. Z. 336, 351 (1962)
Griffin, J.B., N.M. Davidson and R. Penniall: J. Biol. Chem. 240, 4427 (1965)
Griffin J.B. and R. Penniall: Arch. Biochem. Biophys. 114, 67 (1966)
Growther, J.: Analyt. Chem. 26, 1383 (1954a)
Growther, J.: Canad. J. Chem. 32, 42 (1954b)
Growther, J.: Canad. J. Chem. 32, 174 (1954c)
Growther, J.: Canad. J. Chem. 34, 969 (1956)
Harold, F.M.: Biochim. Biophys. Acta 57, 59 (1962)
Harold, F.M.: Colloq. Intern. Centre Natl. Rech. Sci. (Paris) 124, 307 (1965)
Harold, F.M.: Bacteriol. Rev. 30, 772 (1966)
Harold, F.M. and A. Miller: Biochim. Biophys. Acta 50, 261 (1961)
Hase, E., S. Miyachi and S. Mihara: in Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, 619 (Univ.Tokyo Press, 1963)
Healy, R.M.: J. Amer. Chem. Soc. 77, 5258 (1955)
Hettler, H.: J. Chromatog. 1, 389 (1958)
Hoffmann-Ostenhof, O.: Colloq. Intern. Centre Natl. Rech. Sci. (Paris) 106, 640 (1962)
Ingelmann, B.: Acta Chem. Scand. 1, 776 (1947)
Kaltwasser, H.: Arch. Mikrobiol. 41, 282 (1962)

Kanai, R., S. Aoki and S. Miyachi: Plant Cell Physiol. 6, 467 (1957)
Kanai, R. u. W. Simonis: Arch Mikrobiol. 62, 56 (1968)
Kanai, R. u. W. Simonis: Arch Mikrobiol. 63, 29 (1968)
Kandler, O.: Z. Naturforsch. 5b, 423 (1950)
Klein, R.M.: Plant Physiol. 27, 335 (1952)
Kornberg, S.R.: J. Biol.Chem. 218, 23 (1955)
Kornberg, S.R.: Biochim. Biophys. Acta 26, 294 (1957)
Kratz, W.A. and J. Myers: Am. J. Bot. 42, 282 (1955)
Krishnan, P.S., S.P. Damle and V. Bajaj: Arch.Biochem. Biophys. 67, 35 (1957)
Kuhl, A.:Dissertation, Marburg (1957)
Kuhl, A.:in "Ergebnisse der Biologie" (H. Autrum, ed.) 23, 144 (1960) Springer, Berlin
Kuhl, A.: in Physiology and Biochemistry of Algae (R.A. Lewin, ed.) 224, Academic Press 1962
Kuhl, A.: Vortr. Gesamtgebiet Botan. 1, 157 (1962)
Kulaev, I.S. and A.N. Belozersky: Biochimija 22, 587 (1957)
Kulaev, I.S. and A.N. Belozersky: Proc. Acad. Sci. USSR (English Transl.) 120, 128 (1958)
La Manna, C. and M.F. Malette: Arch. Biochem. 24, 451 (1949)
Langen, P.: Biol. Rundschau 2, 145 (1965)
Langen, P. und E. Liss: Naturwiss. 45, 191 (1958a)
Langen, P. und E. Liss: Biochem. Z. 330,455 (1958b)
Langen, P., E. Liss and K. Lohmann: Colloq Intern. Centre Natl. Rech. Sci. (Paris) 106, 603 (1962)
Liebermann, E.M. and P.A. Swenson: Science 142, 1315 (1963)
Lipmann, F.: Phosphorus Metabolism, Bd 1, 521 (1951)
Liss, E. u. P. Langen: Naturwiss. 46, 151 (1959)
Liss, E. and P. Langen:Biochem. Z. 333, 193 (1960)
Liss, E. and P. Langen:Arch. Mikrobiol. 41, 383 (1962)
Lohmann, K.: in: Kondensierte Phosphate in Lebensmitteln. Symposium 1957 in Mainz, 29 (1958) Springer (Berlin)
Lohmann, K. u.P. Langen: in: Dt. Akad. Wiss. Berlin 1946-56 297 (1956)
Lohmann, K. u. P. Langen: Biochem. Z. 328, 1 (1956)

Lynn, W.S. and R.H. Brown: Biochem. Biophys. Res. Commun. 11, 367 (1963)
Lysek, G. u. W. Simonis: Planta 79, 319 (1968a)
Lysek, G. u. W. Simonis: Planta 79, 133 (1968b)
Mandell, J.D. and A.D. Hershey: Analyt. Biochem. 1, 66 (1960)
Mattenheimer, H.: Biochem. Z. 322, 36 (1951)
Mattenheimer, H.: Naturwiss. 40, 530 (1953)
Mattenheimer, H.: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 303, 107 (1956a)
Mattenheimer, H.: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 303, 115 (1956b)
Mattenheimer, H.: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 303, 125 (1956c)
Mattenheimer, H.: in: Kondensierte Phosphate in Lebensmitteln Symposium 1957 in Mainz, 45 (1958) Springer (Berlin)
Mehrotra, R. and V.S. Gupta: J. Polymer Sci. Parta 2, 3963 (1964)
Meissner, J.: Jber. Borstel 1956/57, 4 Bd. 586 (1957) Springer (Berlin)
Meissner, J.: Z. Hyg. Infektionskrankh. 145, 42 (1958)
Miyachi, S.: J. Biochem. (Tokyo) 50, 367 (1961)
Miyachi, S., R. Kanai, S. Mihara, S. Miyachi and S. Aoki: Biochim. Biophys. Acta 93, 625 (1964)
Mudd, St., A. Yoshida and M. Koike: J. Bacteriol. 75, 224 (1958)
Muller-Felter, S. and J.P. Ebel: Bull. soc. chim. biol. 44, 1175 (1962)
Netter, H.: Theorethische Biochemie, Springer (Berlin) 1959
Niemeyer, R. u. G. Richter: im Druck
Penniall, R. and J.B. Griffin: Biochim. Biophys. Acta 90, 429 (1964)
Penniall, R., A.H. Hall, J.B. Griffin and J.L. Irvin: Arch Biochem. Biophys. 98, 128 (1962)
Pierpoint, W.S.: Biochem. J. 65, 67 (1957a)
Pierpoint, W.S.: Biochem. J. 67, 466 (1957b)
Pfrengle, O.: Z. Anal. Chem. 158, 81 (1957)

Rafter, G.W.: Arch. Biochem. Biophys. 81, 238 (1959)
Richter, G.: Nature 212, 1363 (1966)
Richter, G. and H. Senger: Biochim. Biophys. Acta 87, 502 (1964)
Rössel,T.: Z. Analyt. Chem. 196, 6 (1963a)
Rössel,T.: Z. Analyt. Chem. 197, 333 (1963b)
Rössel,T. u. H. Kiesslich: Z. Analyt. Chem. 225, 391 (1967)
Rössel,T. u. H. Kiesslich: Z. Analyt. Chem. 229, 96 (1967)
Rothenbach, E.F. u. St. Hinkelmann: Naturwiss. 41, 555 (1954)
Savioja, T. and J.K. Miettinen: Acta Chem. Scand. 20, 2444 (1966)
Schmidt, G.: in: Mc. Elroy and Glass: Phosphorus Metabolism I, 443 (1951) Baltimore: Johns Hopkins Press
Schwinck, L.: Planta 47, 165 (1956)
Seitz, U.: Dissertation, Tübingen (1969)
Shiokawa, H. and K. Yamana: Exptl. Cell Res. 38, 180 (1965)
Siebert, G.: in "Hoppe-Seyler-Thierfelder's Handbuch d. physiol. und pathol.-chem- Analyse", 6 B, (1966) Springer (Berlin)
Souzu, H.: Arch. Biochem. Biophys. 120, 338 (1967)
Specht-Jürgensen, I. u. R. Bachofen: Planta 79, 222 (1968)
Specht-Jürgensen, I., H. Lutz and R. Bachofen: Febs Letters 1, 265 (1968)
Stahl, A.J.C. and J.P. Ebel: Bull. soc. chim. biol. 45, 887 (1963)
Stahl, A.J.C., J. Bakes, J.H. Weil and J.P. Ebel: Bull soc. chim. biol. 46, 1017 (1964)
Steveninck, J. van and H.L. Booij: J. Gen. Physiol. 48, 43 (1964)
Tamiya, H.: Ann. Rev. Plant Physiologie 17, 1 (1966)
Tanzer, J.M., M.I. Krichevsky and B. Chassy: J. Chromotog. 38, 526 (1968)
Tewari, K.K. and P.S. Krishnan: Arch. Biochem. Biophys. 82 99 (1959)
Tewari, K.K. and M. Singh: Phytochemistry 3, 341 (1964)
Thilo, E.: Angewandte Chemie 67, 141 (1955)

Thilo, E.: Z. Anorg. Allg. Chem. 291, 164 (1957)
Thilo, E.: Naturwiss. 46, 367 (1959)
Thilo, E., H. Grunze, J. Hämmerling u. G. Werz: Z. Naturgg. 11b, 266 (1956)
Thilo, E., G. Schulz u. E.M. Wichmann: Z. Anorg. All Chem. 272, 182 (1953)
Ullrich, W. u. W. Simonis: Planta 84, 358 (1969)
Vagabov, V.M. and I.S. Kulaev: Dokl. Akad. Nauk, SSSR 158, 218 (1964)
Wang, D. and D. Mancini: Biochim. Biophys. Acta 129, 231 (1966)
Wazer, J.R. van: Phosphorus and its Compounds. 1, Chem. (1958) Interscience Publishers
Wazer, J.R. and D.A. Campanella: J. Amer. Chem. Soc. 72, 655 (1950)
Weil, J.H., N. Hebding and J.P. Ebel: Bull. soc. chim. biol. 45, 595 (1963)
Wiame, J.M.: J. Amer. Chem. Soc. 69, 3146 (1947)
Wiame, J.M.: Biochim. Biophys. Acta 1, 234 (1947)
Wiame, J.M.: Rev. Fermentations et Ind. Aliment. 3, 83 (1948)
Wiame, J.M.: J. Biol. Chem. 178, 919 (1949)
Widra, A.: J. Bacteriol. 78, 664 (1959)

Lebenslauf

Am 20. Juli 1939 wurde ich als Sohn des Chemikers Dr. F. Niemeyer und seiner Ehefrau Anneliese Niemeyer geb. Terjung in Genthin bei Magdeburg geboren.

In Genthin besuchte ich die Grundschule und die erste Klasse der Oberschule. Das Abitur legte ich 1957 in Wolfen bei Bitterfeld ab. Da eine Bewerbung an der Universität Jena und 5 weitere Bewerbungen als biologisch chemischer Laborant erfolglos blieben, verließ ich Mitteldeutschland. In Heidelberg machte ich im Oktober 1958 die Ergänzungsprüfung zum Abitur. An der Ruprecht-Karl-Universität begann ich dort als Werkstudent das Biologiestudium mit den Fächern Botanik, Zoologie, Chemie und Physik. Im Oktober 1963 wechselte ich zur Universität Tübingen, wo ich im Januar 1968 die Diplomprüfung ablegte. Neben dem Studium war ich als wissensch. Hilfskraft tätig und seit 1965 bin ich Mitarbeiter an den "Berichten über die wissenschaftliche Biologie".

Im Sommersemester 1967 begann ich meine Dissertation mit dem Thema: "Isolierung und Reinigung der Poly- und Metaphosphate aus der Blaualge Anacystis nidulans" unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Richter im Botanischen Institut der Universität Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:
Becke, Bingel, Bünning, Buchloh, Duspiva, Haxel, Hofmann, Kopfermann, Ludwig, Mägdefrau, Metzner, Möhres, Nast, Nultsch, Querner, Rauh, Reznik, Richter, Rüdorff, Schwartzkopff, Seybold, Sitte, Steiner, Streudel, Wittig, Zähner.

Druckbüro Frau Elly HUTH, 74 Tübingen